



生物化学实验技术丛书

生物物质常用化学分析法

蔡武城 袁厚积 主编

科学出版社



58.1734
721

生物化学实验技术丛书

生物物质常用化学分析法

蔡武城 袁厚积 主编



中科院植物所图书馆



S0011917

科学出版社

1982

23019

内 容 简 介

本书介绍糖类、脂肪类、蛋白质类、核酸类、维生素类、激素类和辅酶类等物质的化学分析法。选用的方法包括生产(医、工、农)、教学和科学研究中常用的、经典的、半微量的或微量的方法以及近年来广泛应用的新方法。每种方法的编写分原理、试剂配制和操作程序。内容具体,切实可行。

本书可供生物化学、生物学、制药工业、医学临床和化验工作的科技人员及有关高等院校师生参考。

生物化学实验技术丛书 生物物质常用化学分析法

蔡武城 袁厚秋 主编

责任编辑 赵甘泉

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1982年8月第一版 开本:787×1092 1/16

1982年8月第一次印刷 印张:13 1/4 插页:1

印数:0001—7,600 字数:302,000

统一书号:13031·1965

本社书号:2671·13—10

定 价: 2.15 元

编 者 的 话

在二十世纪有了惊人发展的生物学中,生物化学是最活跃的分支学科之一。促使生物化学迅速发展的重要因素之一是新技术的开发。

过去一、二十年间生物化学的实验方法日趋专门化和复杂化,牵涉到生化实验工作的领域也越来越多。今天,农业、工业、医学、环境以及生命科学等的研究都涉及生物化学研究,生化实验已成为常规的实验操作了。因此,对于开始进行生化研究的工作者,或者要开拓自身专业领域以外生化研究领域的工作者来讲,都希望能有一本合适的实验指导书。有鉴于此,科学出版社于1977年夏委托中山大学在广州召开了由国内从事生化工作的部分研究所(生物化学研究所、微生物研究所)、大学(中山大学、北京大学、武汉大学、南开大学、南京大学、复旦大学)、工厂(江门甘蔗化工厂、生物化学研究所东风生化试剂厂)参加座谈会,拟定了编写一套切实可行,供有关工作者随时查阅参考的《生物化学实验技术丛书》。

本《丛书》各册编写的内容是建国以来国内已经应用、开展或正在开展的生化技术。随着我国生化研究工作的进展,国外新技术的引进,国内独创技术的开展,将不断补充新的内容。

本《丛书》着重在实验技术,各册内容力求做到:

- (1) 理论部分简洁明了;实验部分力求重复性高;
- (2) 直接接触及实验设计的各项要领;
- (3) 指出实验操作中应注意的地方;
- (4) 尽可能多的举例说明。

本《丛书》的编写,虽经大家共同努力,但缺点错误在所难免,热情希望读者批评指正。如果本《丛书》的出版,能为我国赶超世界先进水平,推动生物化学的进展,实现科学技术现代化作出一些贡献,编者将感到十分高兴。

前 言

本分册《生物物质常用化学分析法》包括糖类、脂肪类、蛋白质类、核酸类、维生素类、激素类和辅酶类等物质常用的化学测定方法。各类物质的定性和定量分析着重于化学的分析法,选用的方法包括国内生产(包括医、工和农)、教学和科学研究上常用的、经典的、半微量的或微量的方法,也有近年来广泛应用的新方法。每种方法的编写主要分原理、试剂配制及操作步骤三个部分,并对需要特别注意或解释之处加以说明。编写过程中力求切实可行,有时同一种物质介绍数种方法,读者可根据自己的要求、实验室条件进行适当的选择。

参加本分册编写的有:复旦大学蔡武城、**袁厚积**、赵志安、朱俭、曹凯鸣;南开大学王诚一、马明、蒋谷人、李翠凤;生物化学研究所东风生化试剂厂顾涵英。复旦大学沈仁权(第二、三和七章);生物化学研究所王德宝(第四章)、潘家秀(第三章)、孙玉昆(第七章);南开大学李建民(第六章);上海第一医学院附属中山医院刘泽民(第二章第三节);上海商品检验局张志贤(第二章第一、二节)等同志在百忙中给予审阅,在此我们谨向这些同志和其他曾给予支持和帮助的许多同志表示衷心感谢。

由于我们业务水平有限,实验经验不足,本书肯定有不少缺点甚至错误,恳请读者批评指出。

蔡武城 **袁厚积**

1980年3月

目 录

第一章 糖类	1
√一、还原糖的测定	1
(一) 斐林试剂热滴定法	1
√(二) 斐林试剂比色法	3
(三) 蒽酮比色法	4
(四) 纳尔逊-索模吉试剂比色法	4
(五) 金氏 (King) 定糖法	5
(六) 哈丁试剂滴定法	6
(七) 3,5-二硝基水杨酸目测法	7
(八) 3,5-二硝基水杨酸比色法	8
二、含醛基糖的测定	9
(一) 次亚碘酸滴定法	9
(二) 邻甲苯胺比色法	11
三、葡萄糖的测定	12
(一) 葡萄糖氧化酶测定法	12
(二) 在硅胶 G 薄层上的分离鉴定及定量测定	13
四、果糖的测定——钼酸铵比色法	14
五、蔗糖的测定——Roe 比色法	15
六、五碳糖的测定——苔黑酚比色法	16
七、氨基葡萄糖的测定	16
八、生物材料中糖类物质的分析	17
(一) 生物材料的预处理的一般方法	17
(二) 苹果中糖类的分离鉴定及定量测定	19
√(三) 小麦籽粒中可溶性糖的鉴定及定量测定	21
参考资料	22
第二章 脂质类	23
第一节 脂肪化学性质的测定	23
√一、碘值	23
二、皂化值	25
三、不皂化值	27
四、酸值	29
第二节 粗脂肪的定量测定	30
第三节 血清中脂质类的测定	31
一、血清 β -脂蛋白	31
二、血清胆固醇	32
(一) 邻苯二甲醛法	32
(二) 改良 Abell 氏法	34
三、血清甘油三酯	35
(一) 直接法	35
(二) 快速法	36

四、血清脂蛋白电泳	38
(一) 醋酸纤维薄膜脂蛋白电泳	38
(二) 聚丙烯酰胺脂蛋白电泳	40

参考资料	42
------------	----

第三章 蛋白质类	43
----------------	----

第一节 氨基酸和蛋白质的定性测定	43
------------------------	----

一、氨基酸的定性测定	43
------------------	----

(一) 氨基酸的一般显色反应	43
----------------------	----

(二) 个别氨基酸的显色反应	46
----------------------	----

二、蛋白质的定性测定	49
------------------	----

(一) 蛋白质的一般显色反应	49
----------------------	----

(二) 复合蛋白质的显色反应	51
----------------------	----

第二节 氨基酸的定量测定	52
--------------------	----

一、氨基酸的一般定量测定	52
--------------------	----

(一) 茚三酮法	52
----------------	----

(二) 三硝基苯磺酸法	54
-------------------	----

(三) 铜复合物紫外吸收法	57
---------------------	----

(四) 邻苯二甲醛法	58
------------------	----

(五) 甲醛滴定法	59
-----------------	----

(六) 非水溶液滴定法	60
-------------------	----

(七) 量气法	62
---------------	----

(八) 酰胺氮测定法	65
------------------	----

二、个别氨基酸的定量测定	68
--------------------	----

(一) 赖氨酸的测定	68
------------------	----

(二) 色氨酸的测定	70
------------------	----

(三) 亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的联合测定	74
-----------------------------	----

(四) 苯丙氨酸的测定	77
-------------------	----

(五) 酪氨酸的测定	79
------------------	----

(六) 脯氨酸的测定	80
------------------	----

(七) 羟脯氨酸的测定	81
-------------------	----

(八) 胱氨酸的测定	83
------------------	----

(九) 谷氨酸的测定	84
------------------	----

(十) 谷氨酰胺的测定	86
-------------------	----

(十一) 巯基的测定	88
------------------	----

第三节 蛋白质的定量测定	89
--------------------	----

一、克氏定氮法	89
---------------	----

(一) 总氮量的测定法	89
-------------------	----

(二) 微量克氏定氮-茚三酮法	92
-----------------------	----

二、福林-酚试剂法	93
-----------------	----

(一) Lowry 基本法	93
---------------------	----

(二) 在有干扰物质存在下的改良测定法	94
---------------------------	----

(三) 简易测定法	95
-----------------	----

三、双缩脲法	95
--------------	----

(一) 双缩脲常量法	96
------------------	----

(二) 双缩脲微量法	96
------------------	----

四、紫外吸收法	97
---------------	----

(一) 280 毫微米的光吸收法	97
------------------------	----

(二) 280 毫微米和 260 毫微米的吸收差法	98
---------------------------------	----

(三) 215 毫微米和 225 毫微米的吸收差法	99
(四) 肽键测定法	90
五、考马斯亮蓝染色测定法	99
第四节 蛋白质的末端测定	101
一、N-末端测定——二甲氨基萘磺酰氯法	101
二、C-末端测定——胍解法	105
参考资料	108
第四章 核酸类	110
第一节 核酸的分离提取	110
一、DNA 的提取	111
(一) 小牛胸腺 DNA 的提取	111
(二) 微生物 DNA 的提取	112
二、RNA 的提取	113
(一) 肝脏 RNA 的提取	113
(二) 酵母 RNA 的提取	114
第二节 核酸及其组分的定量测定	115
一、定磷法	115
(一) 酸解脱磷法	115
(二) 过碘酸氧化脱磷法	117
二、定糖法	118
(一) RNA 的定量测定	118
(二) DNA 的定量测定	120
三、紫外吸收法	122
(一) 标准值测定法	123
(二) 比消光系数法	124
(三) 克分子消光系数法	125
(四) 克原子磷消光系数 ($\epsilon_{(P)}$) 法	125
四、荧光法	126
(一) 微量测定寡核糖核苷酸 3'-末端	126
(二) 微量测定双链核酸	127
五、DNA 中 GC 克分子百分率 [(G + C) %] 的测定	128
(一) 化学方法	128
(二) 物理方法	128
第三节 核酸的水解	130
一、化学水解法	130
(一) DNA 的水解	130
(二) RNA 的水解	130
二、酶促水解法	131
第四节 核酸水解产物的分离鉴定	131
一、层析分离鉴定	131
(一) 纸层析法	131
(二) 薄层层析法	135
(三) 离子交换树脂柱层析法	139
二、电泳分离鉴定	144
(一) 纸电泳分离核苷酸	144

(二) 琼脂糖凝胶电泳分离核苷酸	145
(三) 琼脂糖凝胶圆盘电泳分离 ECoRI 酶解 λ DNA 片段	146
第五节 组织中核酸含量的测定	147
一、组织材料的预处理	147
(一) Schneider 测定法(酸处理法)	148
(二) Schmidt 和 Thannhauser 法(碱处理法)	148
二、大白鼠肝组织核酸含量的测定	148
附录 常用核酸类物质的常数表	151
参考资料	153
第五章 维生素类	154
一、维生素 A 比色测定法	154
二、维生素 B ₁ (硫胺素) 荧光测定法	157
三、维生素 B ₂ (核黄素) 荧光测定法	159
四、维生素 B ₆ (盐酸吡哆醇) 比色测定法	161
五、维生素 C (抗坏血酸) 定量测定法	162
(一) 2, 6 二氯酚靛酚滴定法	162
(二) 2, 4 二硝基苯肼法	163
(三) 碘滴定法	165
六、维生素 D 比色测定法	166
参考资料	168
第六章 激素类	169
一、甾类激素——直接紫外分光光度法	169
二、甾酮——异菸肼反应法	172
三、甾酮——2, 4-二硝基苯肼反应法	174
四、次甲基酮-碱性二硝基苯反应法	176
五、17, 21-二羟基皮(甾)醇——盐酸苯肼反应法	179
六、 α -醇酮基——高碘酸氧化反应法	181
七、 α -醇酮基——四氮唑盐反应法	183
八、甾类酯类——碱性羟胺反应法	184
九、雌激素——铁-酚试剂反应法	185
十、尿中雌(甾)酮、雌(甾)二醇、雌(甾)三醇——Brown 测定法	187
十一、尿中孕(甾)二醇——Kiopfer 测定法	190
参考资料	192
第七章 辅酶类	193
一、辅酶 I——醇脱氢酶法	193
二、还原型辅酶 I——乳酸脱氢酶法	195
三、辅酶 II——葡萄糖-6-磷酸脱氢酶法	196
四、还原型辅酶 II——谷胱甘肽还原酶法	198
五、黄素腺嘌呤二核苷酸——光吸收法	199
六、硫胺素焦磷酸——纸层析法和光吸收法	200
七、磷酸吡哆醇——纸层析法和光吸收法	200
八、磷酸吡哆胺——纸层析法和光吸收法	201
九、辅酶 A——乙酰化酶-磺胺法	202
参考资料	204

第一章 糖 类

朱 俭 曹凯鸣 袁厚积

糖类是自然界分布很广,数量最多的有机化合物,也是生物体生命活动能量的主要来源和生物体必需的组成物质。例如,核酸的骨架中有 D-核糖;某些蛋白质中有糖的成分;细胞膜,细胞壁也有糖类化合物参加构成。特别在植物组织中约有 85—90% 的糖类,它不仅构成植物的躯体和细胞,而且在植物的种子(谷类)和瓜果中都含有大量的糖类。在动物体中糖的含量约占 2%,动物的血液,肝脏、肌肉中都有丰富的糖类物质,因此在生化物质分析中糖类的测定就显得十分重要。

糖类是多羟醛或多羟酮及其缩聚物和它的某些衍生物的总称。通常根据分子中的单糖数目把糖分成三类:(1)单糖,如葡萄糖、果糖和 D-核糖等;(2)二糖、三糖等低聚物,如乳糖、麦芽糖、蔗糖、棉子糖、水苏糖等;(3)多聚糖,是由多个分子的单糖或其衍生物所组成,如淀粉、纤维素、糖原、半纤维素和粘多糖等。

本章介绍还原糖的多种测定方法及含醛基糖、五碳糖的测定方法,并介绍葡萄糖、果糖、蔗糖和氨基葡萄糖专一测定的方法,最后以苹果肉及小麦籽粒为例介绍生物材料中可溶性糖的分离鉴定及定量测定方法。

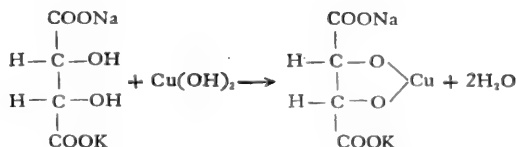
一、还原糖的测定

(一) 斐林试剂热滴定法

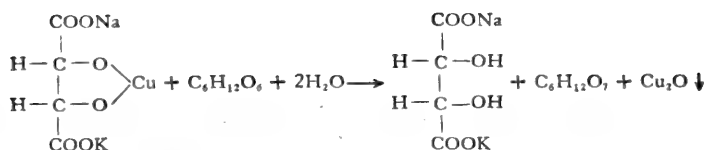
原理

还原糖是指含有自由醛基和酮基的单糖类以及某些二糖如乳糖、麦芽糖。在碱性溶液中还原糖能将两价铜离子等金属离子还原,而糖本身氧化成各种羟酸,以此特性作为糖的定量测定。

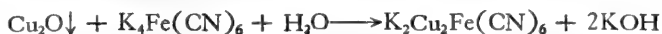
本法采用斐林试剂热滴定法,氧化剂是斐林试剂,它由甲、乙二种溶液组成。甲液含有硫酸铜和次甲基蓝;乙液含有氢氧化钠,酒石酸钾钠和亚铁氰化钾。当甲、乙两液混合时,硫酸铜与氢氧化钠起作用生成天蓝色氢氧化铜沉淀,而酒石酸钾钠在碱性溶液中使沉淀的氢氧化铜溶解而成络合物。



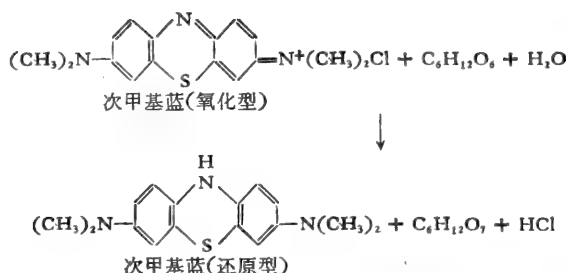
此络合物与还原糖共热时,两价铜即被还原为一价氧化亚铜(红色沉淀)。



氧化亚铜与试剂中亚铁氰化钾反应生成可溶性化合物而不复析出。



斐林试剂中两价铜的还原能力比次甲基蓝强，因此所滴定的葡萄糖溶液首先使两价铜还原，只有当二价铜被还原完毕后才能使次甲基蓝还原为无色，故次甲基蓝在此作为指示剂。



在实验时先做一对照管(不加样品)，用标准葡萄糖滴定一定体积斐林试剂中两价铜和次甲基蓝的量，即测定对照管消耗标准葡萄糖的量(A)。然后做样品管，样品中还原糖消耗斐林试剂中一部分两价铜，剩余的量再用标准葡萄糖滴定，即样品消耗标准葡萄糖量(B)，将(A)减去(B)即可求得样品中还原糖量。

试剂

1. 斐林试剂甲液 称取15克硫酸铜，0.05克次甲基蓝溶于蒸馏水中并定容至1升。
2. 斐林试剂乙液 称50克酒石酸钾钠，54克氢氧化钠，4克亚铁氰化钾溶于蒸馏水中并定容至1升。
3. 标准葡萄糖溶液(0.1%) 精确称取葡萄糖(在105℃干燥至恒重)1克溶于蒸馏水中并定容至1升。
4. 6N 盐酸 量取浓盐酸(35—38%)500毫升加蒸馏水至1升。
5. 6N 氢氧化钠 称取氢氧化钠240克溶于蒸馏水并定容至1升。

操作步骤

1. 空白管测定 取斐林试剂甲、乙液各5毫升，置250毫升三角瓶中，由滴定管加适量0.1%标准葡萄糖溶液，在电炉上加热至沸，然后以4—5秒一滴的速度继续自滴定管中加入标准葡萄糖溶液，滴定至蓝色消失，记下总共所消耗的葡萄糖体积(A)。

2. 样品测定 6—7毫升待测样品溶液(含糖量在3—4毫克/6—7毫升)，加斐林试剂甲、乙液各5毫升，置250毫升三角瓶中，同空白测定一样操作，记下所耗标准葡萄糖体积(B)。

3. 计算

$$\text{还原糖}\% = \frac{(A - B) \times \text{葡萄糖浓度毫克/毫升} \times \text{稀释倍数}}{\text{吸取毫升数} \times \text{样品称量}} \times 100$$

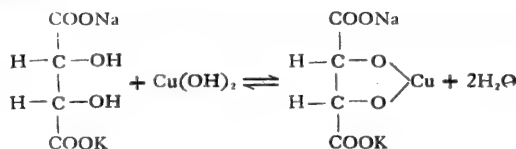
式中：A 为测定空白时耗用的标准葡萄糖毫升数。B 为测定样品时耗用的标准葡萄糖毫升数。

(二) 斐林试剂比色法^[1]

原理

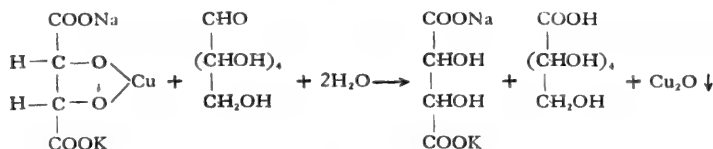
斐林试剂脱色法是热滴定法的一个改进。

斐林试剂是由甲、乙二种溶液混合而成，甲液含有硫酸铜，乙液含有氢氧化钠和酒石酸钾钠。硫酸铜与氢氧化钠作用生成天蓝色的氢氧化铜沉淀 ($\text{CuSO}_4 + 2\text{NaOH} \longrightarrow \text{Cu}(\text{OH})_2 + \text{Na}_2\text{SO}_4$)。而酒石酸钾钠在碱性溶液中使氢氧化铜溶解生成复杂的化合物（一种络合物）。其反应如下：



此复杂的化合物具有与普通铜盐略有不同的天蓝色，但仍有铜盐所有的普通反应。

单糖和多糖的水解物都含有醛基或酮基，在碱性条件下煮沸能使斐林试剂中的二价铜离子还原为一价的氧化亚铜，而使蓝色的斐林试剂脱色，脱色的程度与溶液中含糖量成正比。



此法的优点是操作简便，斐林试剂可不作定量配制，测定误差在 $\pm 0.02\%$ ，但须经常作标准曲线校正。本法测定范围在 0.1—0.5 毫克/毫升还原糖，如果含糖量超过本范围误差显著增大。

试剂

1. 斐林试剂甲 40 克硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶解于蒸馏水并定容至 1 升。
2. 斐林试剂乙 200 克酒石酸钾钠 ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 与 150 克氢氧化钠溶于蒸馏水并定容至 1 升。

在使用前取 20 毫升甲液，加入等体积的乙液。

3. 0.1% 葡萄糖标准液 取 105℃ 干燥 2 小时的恒重葡萄糖 0.1 克，加蒸馏水溶解并定容至 100 毫升。

操作步骤

1. 标准曲线制作 在各试管中分别加入 0.1% 葡萄糖标准液 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 毫升，并分别加蒸馏水补足到 6 毫升，每管含葡萄糖各为 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 毫克，分别在各管中加入 4 毫升斐林试剂，混和后，在试管口用玻璃球盖好，放入沸水浴加热 15 分钟，

取出后在流水中冷却,再经 1500 转/分离心 5 分钟,取上清液在 590 毫微米波长处进行比色测定,以蒸馏水作比色时的对照,读取含不同浓度糖的各管的光密度值和空白管的光密度值。然后把空白管的光密度值减去各管不同浓度糖的光密度值,并以此差值作纵座标,各相对的糖含量作横座标,绘制标准曲线。

2. 样品测定 6 毫升待测样品溶液(适当稀释至 0.5 毫克/毫升左右还原糖量)加 4 毫升斐林试剂并和标准曲线同样操作,在 590 毫微米波长处测出光密度值。最后把不含样品(即不含糖)的空白管光密度值减去样品测得的光密度值,根据此差值在标准曲线上查得糖的含量并乘以样品稀释倍数,计算出单位体积(或重量)样品中的含糖百分量。

(三) 蒽酮比色法

原理

糖在浓硫酸作用下生成糖醛,糖醛与蒽酮 $C_6H_4COC_6H_4CH_2$ 作用能产生一种蓝绿色的物质。蒽酮法适用于己酮糖和己醛糖的测定,在 10~100 微克范围内其颜色的深浅与糖的量成正比关系。由于蒽酮试剂与糖的反应显色强度随时间而变化,因此为使显色强度一致必须在反应后立即进行测定。

试剂

1. 蒽酮试剂 100 毫克蒽酮溶于 100 毫升 98% 硫酸中,呈淡黄色。此试剂须现配现用。

2. 糖标准溶液 精确称取 10 毫克葡萄糖、果糖、木糖或蔗糖,分别以蒸馏水定容到 100 毫升,使成 100 微克/毫升溶液。

操作步骤

1. 糖的标准曲线的制作 取 6 支试管,分别加入 100 微克/毫升的糖标准溶液 0、0.15、0.30、0.45、0.60、0.75 毫升,以蒸馏水补充体积到 2 毫升,使每管内含糖量分别为 0、15、30、45、60、75 微克。加 4 毫升蒽酮试剂,摇匀,沸水浴加热 15 分钟,流动水冷却后测 OD_{620} 值。以含糖量微克数为横座标, OD_{620} 为纵座标制作标准曲线。每一种糖可各自作出相应的标准曲线。

木糖在 620nm 处吸收值较小,采用 580nm 测其 OD 值。

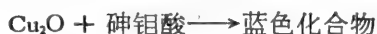
2. 样品含糖量的测定 取待测样品溶液 2 毫升(内含糖 30—60 微克/2 毫升为宜)置于试管内,加 4 毫升蒽酮试剂,摇匀后沸水浴加热 15 分钟,反应完毕以流动水冷却,立即在分光光度计上于波长 620nm 处读取 OD 值。以 2 毫升水代替样品液,如上同样操作并作为空白对照。利用标准曲线计算样品中含糖量。

(四) 纳尔逊-索模吉试剂比色法^[2,3]

原理

纳尔逊-索模吉(Nelson-Somogyi)试剂由硫酸铜、碳酸钠和砷钼酸等组成。葡萄糖在碱性条件下能使二价铜离子还原成低价的红色氧化亚铜,再以砷钼酸溶解并形成蓝色化合物,蓝色的深浅与糖浓度成线性关系,所以可作比色定量测定。

反应如下:



试剂

1. (A)液 称取纯酒石酸钾钠 12 克, 无水碳酸钠 24 克, 加水 250 毫升, 搅匀后向此液中缓慢加入 10% 硫酸铜溶液 40 毫升和碳酸氢钠 16 克。另取 500 毫升热水, 加入无水硫酸钠 180 克, 煮沸驱逐溶解的气体, 冷却后二液注入 1 升容量瓶中混和, 并用蒸馏水定容至 1 升。长期存放后, 如有少量红色氧化亚铜沉淀, 可过滤去除, 滤液可放室温长期保存。

2. (B)液(纳尔逊显色剂) 称取钼酸铵 $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 25 克溶于 450 毫升蒸馏水, 再缓慢加入浓硫酸 21 毫升。另取 25 毫升蒸馏水溶解砷酸氢二钠 $(\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 3 克(也可应用砷酸 $\text{H}_4\text{As}_2\text{O}_7$, $M = 265.96$, 1.28 克溶于 19.24 毫升 1 N 氢氧化钠中, 再加水 4.75 毫升), 然后慢慢加入到上述溶液中, 充分混和, 37°C 放 24—48 小时, 溶液逐渐变黄色, 移到棕色瓶中保存。

3. 葡萄糖标准液(100 微克/毫升) 精确称取 10 毫克葡萄糖, 加蒸馏水定容到 100 毫升。

操作步骤

1. 标准曲线制作 取 100 微克/毫升的葡萄糖标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 毫升, 分别加入各试管, 再以蒸馏水补足各管到 1 毫升。加入 (A) 液 1 毫升, 置沸水浴煮沸 10 分钟, 冷却后加入 (B) 液 1 毫升, 再加蒸馏水 9.5 毫升, 摇匀后在 620 毫微米波长比色测定, 读取光密度值。然后以糖的含量作横座标, 相对应的光密度值作纵座标绘制标准曲线。

2. 样品测定 取 1 毫升待测样品, 含糖量控制在 40—80 微克/毫升。加入试剂量和操作方法同标准曲线制作。测得的光密度值在标准曲线上查出含糖量。

(五) 金氏 (King) 定糖法^[4]

原理

还原糖与碱性铜试剂在加热时能使二价铜还原成一价铜的红色沉淀, 然后用纳尔逊 (Nelson) 试剂(含有砷钼酸的试剂)溶解, 使之成为稳定的蓝绿色化合物。蓝绿色的深浅程度与还原糖浓度成正比, 所以可用比色法测定含糖量。

试剂

1. 铜试剂

(A) 液(硫酸铜溶液 0.6%): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.6 克以蒸馏水溶解后定容至 100 毫升。

(B) 液: 700 毫升水中溶解碳酸氢钠 50 克, 再加入无水碳酸钠 40 克, 使完全溶解。另用 120 毫升热水溶解草酸钾 $[\text{K}(\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ 36.8 克。再另用 100 毫升水溶解酒石酸钾钠 $[\text{KNa}(\text{CHOHCOO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 24 克, 此二液加入到上述溶液中, 最后定容至 1 升。

使用前 A、B 二液等量相混, 但 A 液必须逐滴加到 B 液中, 并边加边摇匀。

2. 纳尔逊显色剂 450 毫升水中加入钼酸铵 $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ $M = 1236.30$

25 克,使溶解之。缓慢加入浓硫酸 21 毫升,并摇匀。另用 25 毫升水溶解砷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 3 克(也可用砷酸 $\text{H}_4\text{As}_2\text{O}_7$, $M = 265.96$, 1.28 克以 1N 氢氧化钠溶液 19.24 毫升溶解,再加入水 4.75 毫升,代替此液)。二液混和后在 37°C 保温 24—48 小时,溶液逐渐变黄,最后移入棕色瓶中保存。使用前以 1 体积试剂加入 2 体积蒸馏水稀释之。

3. 葡萄糖贮存液 1 毫克/毫升 0.1 克葡萄糖先用蒸馏水溶解,再定容至 100 毫升。

4. 测定用葡萄糖标准液 100 微克/毫升 取 10 毫升上述贮存液,用蒸馏水定容至 100 毫升。

操作步骤

1. 标准曲线制作 分别取 100 微克/毫升葡萄糖标准溶液 0、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 毫升,加入到各试管中,并用蒸馏水补足至 1 毫升,再分别加入铜试剂 1 毫升,混合后在管口盖一玻璃球,然后放在沸水浴上加热 10 分钟,迅速冷却到室温,加入 3 毫升纳尔逊试剂,即产生蓝绿色,再加入蒸馏水 3 毫升,摇匀后在 620nm 波长下比色测定,以不含糖的空白管作为比色测定时的对照,读取各测定管的 OD_{620} 值。以葡萄糖含量为横座标,相应的光密度值为纵座标,制作标准曲线。

2. 样品测定 取待测样品 1 毫升(含糖量控制在 40—60 微克/毫升),以后操作完全同标准曲线。样品测定可并列作三个以便纠正误差。将样品所测的光密度值,在标准曲线上查得含糖量,然后按样品的稀释倍数计算出单位体积(或重量)中糖的含量。

(六) 哈丁试剂滴定法^[5]

原理

本法是采用哈丁(Harding)试剂来测定葡萄糖的一种滴定法。哈丁试剂有二部分组成: A 液中有硫酸铜; B 液是含有碘酸钾的酒石酸盐溶液,具有缓冲作用。在测定前 A 液与 B 液等量相混。在加热条件下,试剂和葡萄糖反应,使二价铜还原为一价铜,而一价的低铜又被试剂中碘重氧化。所以只要用硫代硫酸钠滴定法测定反应体系中碘的消耗量即可求得糖的量。

试剂

1. 哈丁试剂

A 液: 0.6% 硫酸铜溶液, 6 克 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 以蒸馏水溶解并定容至 100 毫升。

B 液: 用分析纯试剂配制,每 1 升中含有:

24 克 酒石酸钾钠

40 克 无水碳酸钠

50 克 碳酸氢钠

36.8 克 草酸钾

1.4 克 碘酸钾

碳酸氢钠放在约 700 毫升蒸馏水中溶解,再加入碳酸钠使混和溶解。草酸钾另用 120 毫升温水溶解,并加入到上述溶液中。酒石酸钾钠用 100 毫升水溶解,也加入到上述溶液

中。最后加入固体碘酸钾,使完全溶解,并用蒸馏水将溶液定容至1升,静置后可能有沉淀析出,但对试剂性质不影响,可过滤去除。

应用前 A、B 二液等量混合,但必须将 A 液在边加边摇状况下逐滴地加入到 B 液中。

2. 2% 碘化钾溶液 2 克碘化钾溶解后加水至 100 毫升。此试剂需新鲜配制。

3. 2N 硫酸

4. 0.1N 硫代硫酸钠溶液 25 克硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $M = 248.2$) 溶解在水中后定容至 1 升(每升中加入 1 毫升 20% 碳酸钠和 10 毫升戊醇可以防腐)。此液用碘量法来标定,但在本法中可以不必标定。

5. 0.005N 硫代硫酸钠溶液 25 毫升 0.1N 硫代硫酸钠溶液用蒸馏水稀释至 500 毫升。此液一般不能长期保存。

6. 葡萄糖标准溶液 (1 毫克/毫升) 精确称 100 毫克干燥恒重的纯葡萄糖,以蒸馏水溶解后定容至 100 毫升。

7. 淀粉指示剂 1 克淀粉先用少量冷水溶解,然后加入到 100 毫升沸水中,继续煮沸数分钟成透明液

操作步骤

1. 标准曲线制作 分别吸取标准葡萄糖液 (1 毫克/毫升) 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 毫升加到各大试管中,并用蒸馏水补足到 3 毫升。各管含糖量分别为 200、300、400、500 和 600 微克。各管分别加入 Harding 试剂 1 毫升,在管口盖一玻璃球,沸水浴加热 10 分钟后在流水中冷却,再加入碘化钾溶液 1 毫升,2N 硫酸 1 毫升,摇匀后,用 0.005N 硫代硫酸钠溶液滴定,待溶液呈淡黄色时,加入淀粉指示剂一滴,这时溶液呈蓝色,然后继续滴定至蓝色消失,记下各管所耗的硫代硫酸钠量。空白管滴定值 (A) 是反映试剂中含有的碘量,不同浓度标准葡萄糖测定管所耗的硫代硫酸钠量 (B) 是反映剩余的碘量,只要将 (A) 减 (B) 即为某一浓度葡萄糖和 Harding 试剂反应时所耗的碘量。

以葡萄糖的微克数为横座标,相对应葡萄糖各含量所耗的碘量为纵座标,作出标准曲线。

2. 样品测定 取待测样品 3 毫升(含糖量在 300—500 微克/3 毫升),和标准曲线制作一样操作,把测样品所得的硫代硫酸钠滴定值 (B) 和空白管 (A) 的差值,在标准曲线上查出糖量,并按样品稀释倍数计算出单位体积中糖的含量。

(七) 3, 5-二硝基水杨酸目测法^[6]

原理

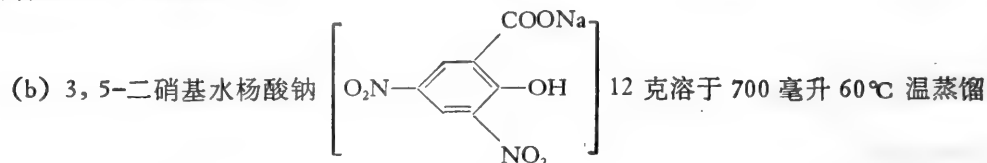
葡萄糖能与 3, 5-二硝基水杨酸钠盐在碱性条件下产生颜色反应,颜色深浅与糖的含量成正比。依据不同浓度的标准葡萄糖溶液与 3, 5-二硝基水杨酸钠盐作用后的标准色管可作比色测定。

试剂

1. 标准葡萄糖溶液 (0.2%) 精确称取 200 毫克葡萄糖,以水溶解并定容至 100 毫升。

2. 3, 5-二硝基水杨酸钠盐溶液

(a) 酒石酸钾钠结晶 400 克溶解于 600 毫升温蒸馏水中。结晶苯酚 13 克加热使溶并与前者混和,以水定容至 1 升。



水中,加入到上述溶液中,混和后会有黄色沉淀产生。

(c) 再加入亚硫酸氢钠 6 克,使充分混和。

(d) 加入 2.5N 氢氧化钠 300 毫升,充分混和,使黄色沉淀溶解。溶液贮存于棕色瓶中,一周后使用。放置 4—5 月后,可能产生沉淀,可过滤后取滤液使用。

操作步骤

(1) 标准葡萄糖糖比色管制作: 分别取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 毫升 0.2% 葡萄糖标准溶液,用煮沸并冷却的蒸馏水补足到 4 毫升,各管含糖量分别为 1、2、3、4、5、6 毫克,再分别加入 3, 5-二硝基水杨酸钠盐试剂 4.0 毫升,混和后在沸水浴上加热 3 分钟,放入流动水中冷却。颜色反应随糖量增加而加深,有真黄,浓黄,黄褐,赤褐变化,可将试管封口后作为标准比色管。

(2) 取待测样品 4 毫升(糖含量可控制在标准比色管糖浓度范围内),加入 3, 5-二硝基水杨酸钠试剂 4 毫升,沸水浴加热三分钟,放流动水中冷却后与标准比色管比较,即可求知糖的量。

(八) 3, 5-二硝基水杨酸比色法

原理

单糖都是还原糖,双糖和多糖就不一定是还原糖、根据单糖、双糖和多糖的溶解度不同的性质可以把还原糖和非还原性糖分离开,再利用酸使没有还原性的双糖和多糖彻底水解成具还原性的单糖,通过 3, 5-二硝基水杨酸试剂与还原糖的呈色反应,即可以分光光度法测定样品中还原糖和总糖的含量。

多糖水解后,葡萄糖分子残基上加了一份水,因而在结果计算中须扣除已加入的水量,测定所得总糖量乘以 0.9 即为实际样品中总糖量。

试剂

1. 0.1% 葡萄糖标准液 精确称取 90℃ 烘至恒重的葡萄糖 100 毫克,以蒸馏水溶解并定容到 100 毫升,使成 1000 微克/毫升。

2. 3, 5-二硝基水杨酸试剂 6.3 克 3, 5-二硝基水杨酸和 262 毫升 2N NaOH 加到酒石酸钾钠的热溶液中(182 克酒石酸钾钠溶于 500 毫升蒸馏水),再加 5 克重蒸酚和 5 克亚硫酸钠于上述溶液内,搅拌使溶解。冷却后以蒸馏水定容到 1000 毫升,贮于棕色瓶中。

3. 6N HCl。

4. 6N NaOH。

操作步骤

1. 葡萄糖标准曲线的制作 取5支试管, 分别加入1000微克/毫升的标准葡萄糖溶液1、2、4、6、8毫升, 以蒸馏水补体积到10毫升。得到一系列不同浓度的标准葡萄糖溶液, 他们的浓度各是100、200、400、600、800微克/毫升。

分别吸取上述不同浓度葡萄糖溶液0.5毫升于5支试管内, 另取1支试管加入0.5毫升蒸馏水。于上述6管内均加入0.5毫升3, 5-二硝基水杨酸试剂并混合均匀。沸水浴加热5分钟后取出以流动水冷却, 每管内再加蒸馏水4毫升, 摇匀。在分光光度计上于540毫微米处读取光密度值。

以葡萄糖含量(微克)为横坐标, 相应光密度值为纵坐标作出标准曲线。

2. 山芋粉样品中还原糖的提取 精确称取山芋粉1克, 放在小烧杯中, 先以少量水调成糊状, 然后加50—60毫升水, 50℃保温20分钟后, 以水定容到100毫升, 过滤、滤液为还原糖提取液, 待测。

3. 山芋粉样品中总糖的水解及提取 精确称取山芋粉0.5克, 放在大试管中, 加6N HCl 10毫升, 水15毫升, 沸水浴加热半小时, 冷却后以6N NaOH调pH至中性(以pH试纸检查)。以水定容到100毫升, 过滤。吸取滤液10毫升于100毫升容量瓶内, 再以水定容到100毫升, 待测。

4. 山芋粉样品中含糖量测定 取7支试管, 3支试管内加0.5毫升还原糖提取液, 3支试管内加0.5毫升总糖水解液, 1支试管内加0.5毫升水, 然后同标准曲线一样操作, 并在标准曲线上求得相应的还原糖含量并按下式计算出山芋粉内所含还原糖与总糖的百分比。

$$\text{还原糖}\% = \frac{\text{还原糖毫克数} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{样品毫克数} \times 0.5} \times 100$$

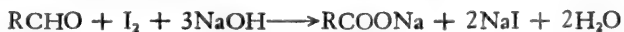
$$\text{总糖}\% = \frac{\text{水解后还原糖毫克数} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{样品毫克数} \times 0.5} \times 0.9 \times 100$$

二、含醛基糖的测定

(一) 次亚碘酸滴定法^[1]

原理

碘在碱性溶液中生成具有强氧化性的次碘酸盐, 它能与醛糖反应, 使葡萄糖氧化生成葡萄糖酸。对酮糖无反应, 因此本法不能用来测定果糖。



醛糖

糖酸盐



利用过量的碘在碱性条件下氧化醛糖, 形成糖酸。然后用硫代硫酸钠滴定剩余的碘, 即可求知葡萄糖量。

本法可测定1—6毫克葡萄糖量, 常应用来测定糖化型淀粉酶活力。

试剂

1. 2% 可溶性淀粉溶液 称取 2 克可溶性淀粉,先用冷水调成乳浆状,倾入 100 毫升沸水中,在搅拌下加热至沸,直到溶液呈透明为止。

2. 3N 硫酸

3. 0.15N 氢氧化钠溶液

4. 0.005N 硫代硫酸钠溶液 称取 12.5 克硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶于煮沸过的冷蒸馏水中,加碳酸钠 0.2 克、溶解后用上述蒸馏水定容至 1 升。一周后用碘酸钾标定。

标定用 0.1N 碘酸钾溶液 将碘酸钾在 104°C 干燥 2 小时,稍冷却后移入干燥器中,冷却后称取 3.567 克,定容至 1 升。

硫代硫酸钠溶液标定 取 0.1N 碘酸钾溶液 10 毫升,加入碘化钾 0.5 克,溶解后加入 2N 硫酸 2 毫升,然后用待标定的 0.05N 硫代硫酸钠滴定至淡黄色,加 2% 淀粉溶液 1 滴,继续滴定至无色。

计算

$$N(\text{硫代硫酸钠}) = \frac{N(\text{碘酸钾}) \times V(\text{碘酸钾})}{V(\text{硫代硫酸钠})}$$

5. 0.1N 碘液 称 36 克碘酸钾溶于 100 毫升蒸馏水中,加入 14 克碘,溶解后加入 3 滴盐酸定容至 1 升。此液要进行标定。

0.1N 碘液的标定 准确吸取 10 毫升待标定的碘液,放入 250 毫升的碘量瓶中,以标定好的 0.05N 硫代硫酸钠溶液滴定至淡黄色,加 2% 淀粉液一滴,继续滴定至无色。

计算

$$N(\text{碘液}) = \frac{N(\text{硫代硫酸钠}) \times V(\text{硫代硫酸钠})}{V(\text{碘液})}$$

如果在实验中作一标准曲线、硫代硫酸钠溶液和碘液就不必进行标定。

6. 葡萄糖标准液 (1 毫克/毫升) 称取 105°C 干燥过的葡萄糖 100 毫克溶于蒸馏水后,定容至 100 毫升。

操作步骤

1. 标准曲线制作 在各碘量瓶中分别加入 0、1、2、3、4、5 毫升标准葡萄糖液 (1 毫克/毫升),每瓶含 1、2、3、4、5 毫克糖量,并分别加蒸馏水补足到 5 毫升,加 0.1N 碘液 5 毫升,摇匀后滴加 0.15N 氢氧化钠 5 毫升,放暗处 15—20 分钟,然后加 3N 硫酸 2 毫升酸化反应液。在 10 毫升微量滴定管中用 0.05N 硫代硫酸钠滴定反应液至淡黄色,加 2% 淀粉指示剂一滴,继续滴定至蓝色消失。将空白滴定的硫代硫酸钠量减去各管滴定值的差值作为纵座标,以相对的糖含量为横座标、绘制标准曲线。

2. 样品测定 取 5 毫升待测样品(样品含糖量适当稀释至 1.5—2.5 毫克/5 毫升左右)在碘瓶中,加 0.1N 碘液 5 毫升,摇匀后滴加 0.15N 氢氧化钠 5 毫升并如标准曲线操作一样,最后将空白滴定值减去样品滴定值,根据其差值在标准曲线上查出含糖量。

计算

若不作标准曲线,样品中葡萄糖含量可以下式求知:

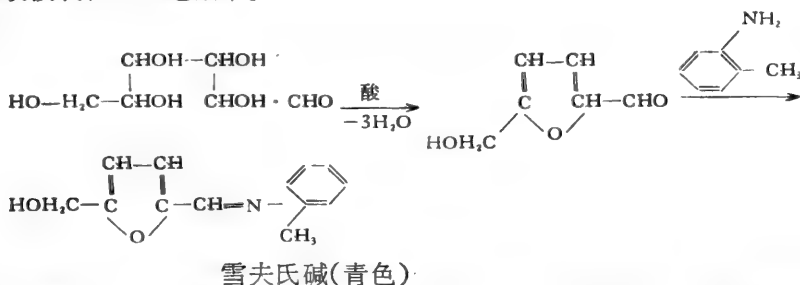
$$\text{葡萄糖量}\% = (v_0 - v) \times 0.009 \times d \times \frac{100}{x} \times \frac{N}{0.1}$$

式中 v_0 为空白消耗硫代硫酸钠毫升数； v 为样品消耗硫代硫酸钠毫升数； d 为稀释倍数； x 为取样测定毫升数；0.009 为 0.1N 碘液与葡萄糖关系常数(因为 1N 碘与半分子六碳醛糖反应,所以 0.1N 碘液,相当于 0.009 克六碳醛糖); 0.1 为碘的当量浓度, N 为硫代硫酸钠当量浓度。

(二) 邻甲苯胺比色法^[8,9]

原理

芳胺类(如苯胺、联苯胺,2-氨基联苯胺和邻甲苯胺等)能在加热的醋酸溶液中与己醛糖呈显色反应,应用最广的是邻甲苯胺。己醛糖在酸性和加热条件下先起脱水作用生成 5-羟甲基-2-呋喃甲醛,再与邻甲苯胺缩合成芳香族第一级胺,青色的雪夫氏(Schiff)碱。其最大吸收波长在 630 毫微米。



本法可测定 0.05—0.6 毫克葡萄糖量。灵敏度和正确性都较好,对葡萄糖的特异性高,也可对麦芽糖、甘露糖、鼠李糖、蔗糖、乳糖进行测定。

试剂

1. 邻甲基苯胺试剂 硼酸 0.55 克溶于 212.5 毫升热冰醋酸中,加入 1.25 克硫脲,溶解后冷却,加入邻甲苯胺 37.5 毫升,配成 250 毫升。
2. 葡萄糖贮存液(10 毫克/毫升) 精确称取 1 克干燥过的葡萄糖,用 0.3% 苯甲酸溶液定容至 100 毫升。
3. 葡萄糖标准液(1 毫克/毫升) 取葡萄糖贮存液 10 毫升,用 0.3% 苯甲酸定容至 100 毫升。
4. 0.3% 苯甲酸液 3 克苯甲酸溶于沸水中并定容至 1 升。

操作步骤

1. 标准曲线制作 吸取标准葡萄糖液(1 毫克/毫升) 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 毫升分别加入各试管中,并用蒸馏水分别补足至 2 毫升,加 4 毫升邻甲苯胺试剂、摇匀后在沸水浴中加热 8 分钟,冷却后在波长 630 毫微米处,读取光密度值。

以糖的含量为横坐标,相应的光密度值为纵坐标,绘制标准曲线。

2. 样品测定 取待测样品溶液 2 毫升(含糖量控制在 0.1—0.2 毫克/毫升),加入试剂量和操作方法同标准曲线,将样品所测光密度值在标准曲线上查得含糖量。并按其稀

释倍数和所取体积,计算单位体积或重量中含糖百分数。

讨论

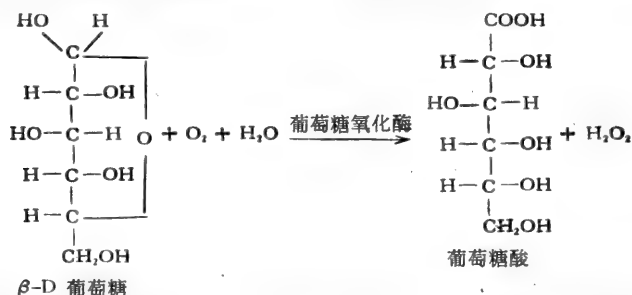
本法对醛糖有特异性,在相同克分子浓度下也可测半乳糖、甘露糖、乳糖、麦芽糖和阿拉伯糖,半乳糖和甘露糖的显色强度同葡萄糖,其他糖的显色强度都低于葡萄糖。戊糖和邻甲苯胺呈橙黄色、最大吸收在480毫微米。谷胱甘肽、维生素C对试剂无干扰,低浓度血红蛋白和胆红素对测定也无明显影响。

三、葡萄糖的测定

(一) 葡萄糖氧化酶测定法

原理

β -D 葡萄糖在葡萄糖氧化酶催化下,氧化成葡萄糖酸,并产生一分子过氧化氢。



过氧化氢在过氧化物酶催化下,氧化氧的受体——邻联甲苯胺 (*o*-Tolidine, 二甲基二氨基联苯)产生有色化合物。

在有足量的葡萄糖氧化酶和过氧化物酶存在的情况下,形成有色化合物的量和葡萄糖的量成正比,以此作为定量测定葡萄糖的依据。本法对葡萄糖有特异性,可在其他糖存在的情况下对葡萄糖进行测定。

试剂

1. 1% 邻联甲苯胺溶液 1 克邻联甲苯胺溶于 100 毫升无水乙醇,贮于棕色瓶中。
2. 醋酸缓冲溶液 (pH5) 300 毫升 0.15N 醋酸 (8.7 毫升冰醋酸定容至 1 升)。700 毫升 0.15N 醋酸钠 (20.4 克 $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 定容至 1 升)相混后,调 pH 至 4.9—5.1 (用氢氧化钠和盐酸调节)。
3. 葡萄糖氧化酶 (Miles Laboratories Inc.) 液体酶制剂,贮于 4℃
4. 过氧化物酶 辣根过氧化物酶 10 毫克溶于 10 毫升水中,放 4℃ 保存(可保存二周)
5. 含邻联甲苯胺试剂 150 毫升 pH5 醋酸盐缓冲液,1 毫升葡萄糖氧化酶溶液,1 毫升过氧化物酶,1 毫升 1% 邻联甲苯胺溶液,混合后保存在 4℃,可存放七周。
6. 标准葡萄糖溶液 100 毫克干燥的葡萄糖溶于 100 毫升 0.3% 安息香酸溶液(安息香酸 0.3 克溶于 100 毫升水),成 1 毫克/毫升。

操作步骤

取三支试管,按如下顺序操作

空白管 蒸馏水 1 毫升

标准管 标准葡萄糖溶液 1 毫升

测定管 待测样品(例如无蛋白血滤液) 1 毫升

待测样品含糖量控制在 400—600 微克/毫升。每隔半分钟依次向上述各管加入含邻联甲苯胺试剂 5 毫升,立即混和并准确反应 10 分钟(夏季反应时间可缩短),在波长 625 毫微米处,仍以每隔半分钟,分别读取光密度值,以空白管作为比色时的对照。

计算

$$\text{葡萄糖(毫克\%)} = \frac{\text{测定管光密度}}{\text{标准管光密度}} \times \text{稀释倍数} \times 100$$

(二) 在硅胶 G 薄层上的分离鉴定及定量测定^[40]

原理

硅胶 G 是一种添加了粘合剂的硅胶粉,约含有 12—13% 的石膏 (CaSO_4),糖在硅胶 G 薄层上的移动速度与糖的分子量和羟基数有关。经过合适的溶剂展开后,糖在薄板上的移动速度是戊糖 > 己糖 > 双糖 > 三糖。若用硼酸溶液调制硅胶 G 可改进分离效果。对已分开的斑点显色,而将与它位置相当的另一个未显色的斑点从薄层上与硅胶 G 一起刮下,以适当溶剂将糖从硅胶 G 上洗脱下来,即可用糖的定量测定方法测出各组分的含糖量。

试剂

1. 1% 糖的标准溶液 精确称取木糖、葡萄糖、果糖和蔗糖各 100 毫克,分别用 75% 乙醇定容到 10 毫升,使成 10 微克/微升的溶液。

2. 0.1M 硼酸 (H_3BO_3)。

3. 层析溶剂 氯仿:甲醇 = 60:40(V/V)。

4. 苯胺-二苯胺-磷酸显色剂 1 克二苯胺,1 毫升苯胺,5 毫升 85% 磷酸溶于 50 毫升丙酮。

5. 蒽酮试剂 100 毫克蒽酮溶于 100 毫升 98% 硫酸(此试剂必须现用现配)。

操作步骤

1. 硅胶 G 薄层的制备 称取硅胶 G 粉 30 克,加 75 毫升 0.1M 硼酸溶液,调匀后铺于洁净的玻璃板上,约可铺 10 × 20 厘米薄板四块,5 × 20 厘米薄板一块。铺层后的薄板放在 100℃ 烘箱中烘干,取出后放在干燥器中备用。

2. 糖在硅胶 G 薄层上的分离 取 10 × 20 厘米硅胶 G 薄板一块,在距底边 1.5 厘米处作四个记号,相互间隔为 2 厘米。每个记号上分别点上 1 微升各种标准糖溶液,点子的直径约 2 毫米。待薄层上样品自然干燥后把薄层玻板放到盛有层析溶剂(氯仿:甲醇)的层析缸中,当展层溶液到达离薄板顶端 1 厘米处时取出薄板,在 60℃ 烘 2—3 小时,除尽

溶剂后均匀地喷上苯胺-二苯胺-磷酸显色剂, 85℃ 烘 10 分钟, 各种糖分别显出不同颜色的斑点。记下各斑点的颜色和 R_f 值。

3. 糖的定量测定 取五块 10 × 20 厘米硅胶 G 薄层板, 用大头针在每块板上每隔 2 厘米处作上记号, 每块板上点相同的五个样。五块硅胶 G 薄板上分别点 1、2、3、4、5 微升的 1% 糖标准溶液五点, 使含糖量各为 10、20、30、40、50 微克。以氯仿-甲醇溶剂展层, 待溶剂前沿到达离顶端 1 厘米处时取出。取尽溶剂后, 每块板中间三个样品层析部位的玻璃盖住, 左右二边层析部分用苯胺-二苯胺-磷酸显色进行定位。根据已显色斑点的位置, 用刀片刮下中间三个样品相应部位的硅胶 G 并放在试管中, 同时在空白区刮下相同面积的硅胶 G 作测定时的空白对照用, 于上述各管内加 1 毫升蒸馏水, 室温浸提 1 小时后过滤, 取滤液并加 2 毫升蒽酮试剂于内, 沸水浴加热 15 分钟, 冷却后在波长 620nm 处测其 OD 值, 求出各种含糖量的 OD_{620} 平均值。以含糖微克数作横座标, OD_{620} 平均值作纵座标, 画出标准曲线。以同样方法分别作出各种糖的标准曲线。

待测溶液按上述方法进行层析后部分显色, 确定分离所得斑点的层析后部位, 并通过 R_f 值或与标准糖的层析图谱比较确定是何种糖, 然后在未显色的薄层相应位置刮下相同面积的硅胶 G, 按标准曲线制作方法同样操作, 得到的 OD_{620} 值可利用相应的糖的标准曲线求出该糖的含量, 并能计算待测溶液中各种糖所占的百分比。

四、果糖的测定——钼酸铵比色法^[11]

原理

在酸性条件下钼酸铵与果糖能生成蓝色化合物。在一定糖浓度范围内, 所形成的蓝色深浅与含糖量成正比。

本实验操作方法简便, 灵敏度也好, 适宜对 10—100 微克/毫升糖量的测定。

测定

1. 显色剂

A 液 (5N 硫酸) 取 140 毫升浓硫酸加入到 860 毫升蒸馏水中。

B 液 (16% 钼酸铵溶液) 取 80 克钼酸铵, 溶解在水中并定容至 500 毫升。

使用前, 将上述 A 液和 B 液等量相混和即成。

2. 果糖标准溶液 (100 微克/毫升) 精确称取真空干燥 (55℃) 24 小时的果糖 0.1 克, 溶于 100 毫升水, 使成 1 毫克/毫升果糖标准液。然后再稀释 10 倍成 100 微克/毫升标准果糖溶液。

操作步骤

1. 标准曲线制作 取 100 微克/毫升的标准果糖溶液 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 毫升到各试管中, 并用蒸馏水补足到 2 毫升, 各管含果糖量分别为 0、10、20、40、60、80、100 微克, 然后加入 4 毫升显色剂, 摇匀后放 80℃ 水浴保温 30 分钟, 冷却后在 650 毫微米波长分别测定光密度值。然后以各果糖含量作横座标, 相对应的光密度值作纵座标, 绘制标准曲线。

2. 样品测定 取 2 毫升待测样品,糖浓度控制在 20—40 微克/毫升,加入试剂量 and 操作方法同标准曲线制作,测得的样品光密度值在标准曲线上查出果糖含量。

讨论

本法对果糖测定较灵敏,快速。对蔗糖也有显色反应,在相同浓度范围内也成直线关系,但呈色反应较果糖浅,光密度值比果糖低。对葡萄糖在相同浓度范围内几乎没有显色反应,所以此法不能测定葡萄糖。

五、蔗糖的测定——Roe 比色法^[12]

原理

六碳糖与浓盐酸作用产生羟甲基糠醛、但酮糖比醛糖产生的羟甲基糠醛的量要多得多(1—1.5% 酮糖与 20% 醛糖所产生的羟甲基糠醛量相等)。此羟甲基糠醛在一定条件下和酚类化合物——间苯二酚形成鲜红色。此反应在一定条件下为酮糖所特有,所以可作为酮糖测定的依据。近年来有人采用氢氧化钠来破坏植物组织中的果糖,而没用间苯二酚法来定量测定蔗糖。采用此法只要将植物组织,如种子、块茎、块根或叶片经研磨后用 82% 热乙醇多次抽提,除去乙醇的提取液即可直接用来定量测定蔗糖,提取液中尽管同时存在果糖、葡萄糖或麦芽糖等但不影响蔗糖的测定。本法对色素较少的组织误差甚少。其测定范围在 40—300 微克。

试剂

1. 间苯二酚溶液 0.1 克间苯二酚用 6N 盐酸溶液溶解后定容至 100 毫升。
2. 10N 盐酸
3. 2N 氢氧化钠
4. 蔗糖标准溶液(1 毫克/毫升) 精确称取 0.10 克恒重蔗糖 0.1 克以蒸馏水溶解并定容至 100 毫升。

操作步骤

1. 标准曲线制作 先用水把 1 毫克/毫升蔗糖标准溶液稀释成 0.4 毫克/毫升蔗糖溶液,然后吸取 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、0.9 毫升,分别加入各试管,再用蒸馏水使各管补足到 0.9 毫升。各管中含蔗糖量分别为 0、40、80、160、240、320、360 微克,各管中分别加入 0.1 毫升 2N 氢氧化钠溶液(氢氧化钠的最终浓度为 0.2N),混和后在 100℃ 沸水浴中加热 10 分钟,立即在流水中冷却。再加入间苯二酚溶液 1 毫升,10N 盐酸 3 毫升,摇匀后放 80℃ 水浴中加热 8 分钟,冷却后在 500 毫微米波长处测光密度值。以蔗糖含量为横座标,相对应的光密度值为纵座标绘制标准曲线。

2. 样品测定 取待测样品溶液 0.9 毫升,(蔗糖含量为 40—250 微克/毫升),加 0.1 毫升 2N 氢氧化钠溶液并与标准曲线制作操作方法相同。测得 500 毫微米处光密度值,然后根据所测光密度值在标准曲线上查出含糖量。

讨论

(1) 本法可以在含有葡萄糖、果糖、麦芽糖和蔗糖的混合液中测定蔗糖,对色素不多的植物组织,蔗糖测定的误差甚小。

(2) 在测定过程中加热时间、温度和试剂配量的正确与否都可影响测定结果。加热时试管口最好盖上玻璃小球。

六、五碳糖的测定——苔黑酚比色法^[7]

原理

五碳糖如木糖在浓盐酸和三氯化铁存在下与苔黑酚煮沸时呈蓝绿色反应。在一定范围内显色程度与糖浓度成正比,所以可进行比色测定。

本法对木糖的测定范围在 10—100 微克。测定时要严格控制反应条件,特别是加热时间,才能取得较满意的结果。

试剂

1. 0.1% 三氯化铁盐酸溶液 100 毫升 36% 浓盐酸中加入 0.1 克三氯化铁。
2. 苔黑酚乙醇溶液 0.1 克苔黑酚加入 10 毫升 95% 乙醇溶液配成。
3. 木糖标准溶液 (100 微克/毫升) 0.1 克木糖溶于少量蒸馏水中,定容到 100 毫升。取上述浓溶液 1 毫升稀释到 10 毫升,即成 100 微克/毫升溶液。

操作步骤

1. 标准曲线制作 吸取 100 微克/毫升木糖标准溶液。0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0 毫升,分别加入到各试管中,用蒸馏水补足到每管 3 毫升,使各管木糖浓度分别为 0、10、20、30、40、60、80、100 微克。各管加入 0.1% 三氯化铁盐酸溶液 3 毫升,再加入苔黑酚乙醇溶液 0.3 毫升,混合后放沸水浴加热 20 分钟,立即放在流水中冷却。在 670 毫微米波长处测得各管的光密度值。以木糖含量为横座标、各管测得的光密度值为纵座标,绘制标准曲线。

2. 样品测定 取 3 毫升待测样品(糖浓度控制在 40—80 微克)加入试剂量和操作方法与标准曲线制作相同,样品所测之光密度值在标准曲线上可查出样品含糖量。

七、氨基葡萄糖的测定^[13]

原理

在碱性溶液中氨基糖与乙酰丙酮于 100℃ 下反应能形成有色物质,此种有色物质在酸性条件下用二甲基氨基苯甲醛处理可以呈现红色,因此用比色法可定量测定氨基葡萄糖。

试剂

1. 乙酰丙酮试剂 1 毫升重蒸乙酰丙酮(沸点 138—140℃)溶于 50 毫升 0.5N

Na_2CO_3 溶液中,此试剂在每次测定前配制。

2. 对-二甲基氨基苯甲醛试剂 (Ehrlich's 试剂) 0.8 克对-二甲基氨基苯甲醛溶于 30 毫升乙醇中,加 30 毫升浓 HCl 。该溶液呈淡黄色。

3. 1% 氨基葡萄糖盐酸盐标准溶液 精确称取 1 克氨基葡萄糖盐酸盐,以蒸馏水定容到 100 毫升。取些溶液再以蒸馏水稀释 100 倍,使成 100 微克/毫升溶液。

4. 无水乙醇

操作步骤

1. 标准曲线制作 取 6 支具刻度试管,分别加 100 微克/毫升的氨基葡萄糖标准液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 毫升,以水补足体积到 2 毫升,使各管内含氨基葡萄糖盐酸盐分别为 0、20、40、60、80、100 微克。加 1 毫升乙酰丙酮试剂到上述试管内、摇匀,试管口用玻璃小泡作盖封住以防止乙酰丙酮逃逸,沸水浴中加热 20 分钟,用冷水浴使冷到室温。加入无水乙醇 5 毫升后加 1 毫升对-二甲基氨基苯甲醛试剂,再以无水乙醇补足反应液总体积到 10 毫升。待试管内物质充分混和后在 65—70℃ 水浴中温热 10 分钟以加速二氧化碳的释放,用冷水浴冷却到室温。用水代替氨基葡萄糖样品,同上一样处理作测定用的空白对照管,在波长 530nm 处测 OD 值。以氨基葡萄糖微克数作横座标, OD_{530} 为纵座标作出标准曲线。

2. 样品测定 粘多糖、粘蛋白和软骨制备物(样品中氨基己糖的量不低于 200 微克)封在安瓿管中,以 2 毫升 4N 盐酸于 100℃ 下加热水解 14 小时。水解后打开安瓿管,样品经真空干燥,残渣以水溶解成一定体积,使所得的氨基己糖样品溶液的最终浓度为 100 微克/毫升左右。取一定量的样品溶液按标准曲线制作同样操作。利用标准曲线计算样品中氨基己糖的含量。

八、生物材料中糖类物质的分析

(一) 生物材料的预处理的一般方法

在分析生物材料中的糖类物质之前要进行预处理。所谓预处理,一是对生物材料中糖分的提取;二是除去糖测定过程中的干扰物质,如植物组织中的单宁、色素、蛋白质等,动物血液中的蛋白质等;三是如果要测定低聚糖或多聚糖,则要对样品进行水解使之转化为单糖便行测定;四是在必要时还要对生物组织提取液中的各种糖类进行分离,然后进行测定。

现就植物材料和动物材料一般预处理的方法分别叙述如下:

1. 植物材料 植物材料中的糖存在于细胞中,因此必须先对被分析的植物材料进行研磨,使成糊状或粉状物,然后依据糖易溶于水这一性质,加入一定量的蒸馏水,并在 75—80℃ 的水浴上加热一小时,然后定容至一定体积,经过滤取滤液进行糖的测定。

对某些含有大量淀粉或菊糖的植物材料,在用水提取糖时常常会使这些物质部分地或全部地带入到提取液中而使测定结果偏高,这时可采用 25—80% 的乙醇在回流情况下(每次 30 分钟)提取。提取液经蒸去乙醇,以水定容到一定体积,再测定糖。

有些植物材料,除去糖以外还有其他还原性物质或影响过滤的物质如蛋白质等,这时

就必须用 10% 中性或碱性醋酸铅溶液沉淀去除这些干扰物质。具体方法是将醋酸铅一滴滴地加入到热的未定容的提取液中,通常开始的沉淀是呈大块状,以后呈絮状,此时再加 1—2 滴醋酸铅,使沉淀完全为止,提取液经过滤,在滤液中再逐滴加入饱和硫酸钠,直到多余的铅完全沉淀为止,经过滤去除沉淀,滤液最后定容至一定体积,取一定量进行糖的测定。

如果要测定植物材料中的低聚糖、如二糖、三糖等可取植物材料的提取液,按 16:1 的体积比加入 2% 盐酸,在 80℃ 水解半小时,再用饱和碳酸钠中和(甲基红作指示剂),然后再经醋酸铅沉淀蛋白质,用硫酸钠去除多余的铅,过滤后滤液定容至一定体积,取其进行含糖量测定,这时测得的含糖量减去未经水解的提取液含糖量即为测定材料中低聚糖的量。

在进行淀粉含量测定时,常常是将植物材料磨碎后称量,加入 3% 盐酸,在沸水浴上水解 3—4 小时,并随时用碘来试验是否水解完全,冷却后用 10% 氢氧化钠中和水解所用的酸。最后用上述的醋酸铅沉淀方法去除干扰物质,并定容至一定体积,取一定量定糖。这时所测得的糖量乘以 0.9 (因淀粉水解时要加入水分子)即为植物材料的总糖量。此总糖量减去酸水解前可溶性糖量即为淀粉含量。对于含纤维素多的材料,因酸水解会使淀粉含量测定结果偏高,最好使用淀粉酶水解方法就可避免这一偏差。

2. 动物材料——血液的去蛋白质

(1) 无蛋白血滤液制备: 在血糖含量测定前必须先去除蛋白质,使成为无蛋白质的血滤液。去除蛋白质的方法虽多,但不外乎是采用蛋白质沉淀剂。如果是全血,则要使用抗凝剂。抗凝剂的成分是: 草酸钾 2 克,氟化钠 1.5 克加蒸馏水 100 毫升。每支试管加入抗凝剂 0.1 毫升,110℃ 烘干此试管,此管可抗凝全血 1 毫升。抗凝剂中加氟化钠较好,它可以抑制血糖的酵解作用。常用去蛋白质的方法有如下几种:

(A) 钨酸钠-硫酸法: 取全血(加抗凝剂)1 毫升放入 20 毫升三角瓶中,加蒸馏水 7 毫升,摇匀后使溶血,加入 10% 钨酸钠 1 毫升并摇匀,然后加入 0.7N 硫酸 1 毫升,随加随摇,加毕后充分振荡,放置 5—15 分钟,当沉淀变为暗棕色时,用干滤纸过滤,每毫升滤液相当于 1/10 全血。

(B) 硫酸锌方法:

(a) 0.45% 硫酸锌 5 毫升和 0.1N 氢氧化钠 1 毫升混合使形成胶体溶液,然后加入血液 0.1 毫升,在沸水浴中加热 4 分钟(准确!),冷却后用棉花过滤,滤液可直接用来测糖(适用于滴定法定糖)。

(b) 在试管中加入 1 毫升 0.3N 氢氧化钡,蒸馏水 7.5 毫升,混和后加入 0.5 毫升全血,血清或血浆,混合后放置半分钟,再加入 1 毫升 5% 硫酸锌,混匀后放置 2 分钟,过滤或离心,滤液为 1:20 无蛋白质滤液。如果用手指血,可取血 0.1 毫升,蒸馏水 1.5 毫升,氢氧化钡和硫酸锌的用量各为 0.2 毫升、处理方法同上述。

硫酸锌和氢氧化钡的配制: 5% 硫酸锌(50 克 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 水溶解后定容至 1 升)。0.3N 氢氧化钡(称取 $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 94 克,水溶解后定容至 1 升)贮于瓶中,放碱石灰中保护免受空气中二氧化碳作用。

0.3N 氢氧化钡和 5% 硫酸锌溶液配制后要调节浓度,方法如下: 100 毫升三角瓶中加入 10 毫升 5% 硫酸锌溶液和 25 毫升水,用酚酞作指示剂,以 0.3N 氢氧化钡滴定至浅

红色终点。氢氧化钡溶液的滴定用量应为 10.0 ± 0.1 毫升。二种溶液中任何一种过浓都需进行稀释后再标定。

(2) 不溶血的无蛋白的血滤液制备：采用等渗的硫酸钠溶液来稀释血液，使血球不致遭受破坏，然后再用蛋白质沉淀剂去蛋白质。

(A) 硫酸钠-硫酸锌试剂法：该试剂由 55 毫升 10% 硫酸锌溶液(10 克 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 水溶解后定容至 100 毫升)加等渗硫酸钠溶液 (30 克 $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 或 13.2 克无水硫酸钠溶解于水中后定容至 1 升)至 1 升体积配成。

取血液 0.1 毫升，加 1.8 毫升硫酸钠-硫酸锌试剂和 0.1 毫升 0.5N 氢氧化钠(此碱液要经 10% ZnSO_4 溶液标定：10 毫升 10% ZnSO_4 溶液加水稀释至约 50 毫升，用 0.5N 氢氧化钠滴定至酚酞指示剂呈红色，氢氧化钠的滴定量应在 10.8—11.2 毫升)，混和后离心，取上清液测定糖，这时上清液为全血的 1/20 浓度。

(B) 等渗硫酸钠和钨酸钠法：0.1 毫升血液和 3.8 毫升等渗硫酸钠-硫酸铜试剂(300 毫升 3% $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 溶液和 30 毫升 7% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液混和配成)混和后可在室温放置几个小时(硫酸铜可抑制血液的酵解作用)。在测糖前加入 0.1 毫升 10% 钨酸钠溶液，使蛋白质沉淀，离心后取上清液测糖含量，此血滤液稀释了 40 倍。

(二) 苹果中糖类的分离鉴定及定量测定^[14]

原理

以乙醇抽提苹果中的可溶性糖类。由于糖为中性物质，在一般情况下不能解离，因而不会形成离子；提取液中的氨基酸和有机酸在一定条件下以离子形式存在。通过阳、阴离子交换树脂的处理基本上能除去氨基酸、有机酸以及其他呈离子形式的物质。经此纯化的糖混合液经层析分离可以鉴定含有何种糖，并能定量测定各种糖的含量。

试剂

1. “732”强酸型阳离子交换树脂

阳离子交换树脂的预处理及转型：取 10 余克“732”强酸型阳离子交换树脂，加 100 毫升蒸馏水搅匀，待沉降后倾去上层微细颗粒，重复三次。树脂中加入 50 毫升 2N HCl，80℃ 下不断搅拌 30 分钟，倾去 HCl，用 80℃ 蒸馏水洗树脂，重复数次使 pH 到 6—7。再加 2N NaOH 50 毫升，80℃ 下搅拌 30 分钟，再用水洗至 pH 7—8。复用 50 毫升 2N HCl 按上法处理，用水洗至中性。此时树脂为 H^+ 型。

2. “717”强碱型阴离子交换树脂

阴离子交换树脂的预处理及转型：10 克树脂与阳离子交换树脂同样方法，水漂去微细颗粒。加 50 毫升 3N NaAc 搅拌 30 分钟后水洗至中性。再加 2N HCl 50 毫升处理 30 分钟，水洗至中性。最后仍以 3N NaAc 处理，并用水洗至中性。此时树脂为 Ac^- 型。(阴离子交换树脂在 3N NaAc 溶液中会浮起，故用布氏漏斗抽滤进行水洗。)

3. 80%、95% 乙醇

4. 2N HCl

5. 2N NaOH

6. 3N NaAc (醋酸钠)

7. 1% 糖的标准溶液 精确称取木糖、葡萄糖、果糖、蔗糖各 100 毫克，以 75% 乙醇定容到 10 毫升，使成 10 毫克/毫升的溶液。

8. 层析溶剂 正丁醇:醋酸:水=4:1:5(V/V)

9. 苯胺-二苯胺-磷酸显色剂 1 克二苯胺, 1 毫升苯胺, 5 毫升 85% 磷酸溶于 50 毫升丙酮。

9. 蒽酮试剂 100 克蒽酮溶于 100 毫升 98% 硫酸(此试剂必须现用现配)。

操作步骤

1. 苹果中糖抽提液的制备 取洗净的苹果, 削去果皮, 称 10 克果肉。在研钵中将果肉磨成匀浆, 加 20 毫升 95% 乙醇抽提 30 分钟, 3000 转/分离心 10 分钟, 取上清液, 残渣加 5 毫升 80% 乙醇洗涤, 离心取上清液, 重复二次, 合并上清液。此上清液减压浓缩至干, 并加 2 毫升水使溶解, 此溶液即为糖抽提液。

2. 苹果抽提液中氨基酸与其他阳离子的分离 取 10 克粒度为 80 微米的“732”强酸型阳离子树脂, 预先处理成 H^+ 型。树脂均匀装在 1×20 厘米的柱中, 10 克苹果肉所得 2 毫升抽提液全部转移到此阳离子交换树脂上, 以蒸馏水洗脱(流速不能太快!)。用一干净小烧杯收集柱下流出的洗脱液, 直至流出液无糖的反应为止(以蒽酮试剂检查, 方法见蒽酮法)。

3. 苹果抽提液中有机酸等阴离子的分离 取 10 克粒度为 80 微米的“717”强碱型阴离子交换树脂, 预先处理成 Ac^- 型。树脂均匀地装到 1×20 厘米的柱中。把上述从阳离子交换树脂中流出的洗脱液全部仔细地加在阴离子交换树脂柱上, 用干净的容器收集流出液, 柱以蒸馏水洗涤, 直到流出液无糖的反应为止(以蒽酮试剂检查)。量取洗脱液体积, 取其中 $1/10$, 放在表面皿上, 以沸水浴蒸发至干, 残渣用 1 毫升蒸馏水溶解。此 1 毫升经离子交换树脂纯化的样品溶液相当于 1 克苹果肉抽提所得的糖混合液。

4. 苹果抽提液中糖的分离鉴定 取 30×35 厘米层析滤纸一张, 分别点上木糖、葡萄糖、果糖、蔗糖标准溶液 3—4 微升, 同时点不同量的抽提液数点。以正丁醇:醋酸:水=4:1:5(V/V) 溶剂展层, 下行层析约 70 小时。层析后除尽层析溶剂, 以苯胺-二苯胺-磷酸溶液显色。根据显色斑点的 R_f 值以及颜色可确定抽提液中所存在的糖类(与标准糖溶液层析斑点相比较), 又根据显色结果可对抽提液选择合适的点样量。

5. 苹果抽提液中糖的定量测定 取一张层析滤纸作七个记号, 二边分别点 10 毫克/毫升的标准葡萄糖液 3—4 微升, 含葡萄糖 30—40 微克; 中间五个记号上分别点上 1.5、3.0、4.5、6.0、7.5 微升的标准葡萄糖溶液, 使分别含有 15、30、45、60、75 微克的葡萄糖。如上述方法一样展层。层析后对二边二个样品的滤纸进行显色。根据已显色的斑点位置及大小剪下滤纸中间相应的未显色的斑点, 并在斑点附近剪同样大小的空白滤纸作为比色测定的对照。滤纸片置于试管中, 加 2 毫升蒸馏水, 洗脱二小时, 洗脱液经烧结玻璃漏斗过滤除去纤维素(纤维素的存在会影响蒽酮法测糖的结果)。滤液中加入 4 毫升蒽酮试剂, 沸水浴加热 15 分钟, 冷却后在波长 620nm 处读取 OD 值。以点样的葡萄糖微克数为横座标, OD_{620} 为纵座标, 制作葡萄糖层析后定量测定的标准曲线。

用同样方法分别制作果糖、木糖、蔗糖的纸层析分离后定量测定的标准曲线。

按适宜的点样量在滤纸上点上苹果抽提液 5 点, 同上法层析后按二边样品显色的斑点在滤纸中间的相应部位剪下未显色的斑点, 同时剪下同样大小的空白滤纸作比色测定对照用。每滤纸片分别用 2 毫升蒸馏水抽提二小时, 抽提液经过滤后用蒽酮法测定糖的

含量。根据测定结果可计算出各种糖的百分含量,并计算出每克苹果中所含糖的量。

(三) 小麦籽粒中可溶性糖的鉴定及定量测定

原理

利用乙醇抽提小麦籽粒中的可溶性糖,抽提液经下行纸层析可把各种糖类分离开,显色后可确定各种糖在层析谱上的位置。根据 R_f 值或与标准糖类层析谱对比能断定抽提液中所含糖的种类。若在展层后剪下滤纸上相应斑点的部位,以水洗脱滤纸上的糖,用蒽酮法可定量测定其含量。

试剂

1. 1% 糖的标准溶液 准确称取葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、棉子糖和果聚糖各 100 毫克,以 75% 乙醇定容到 10 毫升,使成 10 微克/微升的溶液。

2. 层析溶剂 正丁醇:醋酸:水 = 4:5:1 (V/V)

3. 苯胺-二苯胺-磷酸显色剂 1 克二苯胺,1 毫升苯胺,5 毫升 85% 磷酸溶于 50 毫升丙酮。

4. 蒽酮试剂 100 毫克蒽酮溶于 100 毫升 98% 硫酸。此试剂必须现配现用。

5. 82% 乙醇

操作步骤

1. 小麦籽粒中可溶性糖的抽提 称取 0.3 克小麦籽粒,在研钵中磨成粉末,加 82% 乙醇 10 毫升,70℃ 下保温 30 分钟,3000 转/分离心 15 分钟,移出上清液。残渣中再加 82% 乙醇 5 毫升,70℃ 下提取 5 分钟,离心取上清液,如此重复三次,合并上清液,记取体积。

2. 小麦籽粒 82% 乙醇抽提液中含糖量的测定 取一定体积的抽提液(使含糖量在 20—50 微克范围内),按蒽酮法测定糖的量。根据抽提液总体积计算 0.3 克小麦籽粒中糖的总量,并求得小麦籽粒中可溶性糖的百分含量。

3. 小麦籽粒 82% 乙醇抽提液中糖的种类的鉴定 上述抽提液减压浓缩至干,然后加 3 毫升水溶解干物质以做层析用。取 25×38 厘米滤纸一张,将各种标准糖溶液分别点样于纸上,同时将不同体积的样品溶液点于同一张滤纸上。以正丁醇-醋酸-水为层析溶剂作下行层析。约 70 小时后取出、除尽溶剂,用苯胺-二苯胺-磷酸显色溶液显色,在 85℃ 加热 10 分钟后,根据样品与标准糖溶液层析后斑点的位置及颜色可确定样品液中有何种糖,并选择适宜的点样量以作定量分析用。

4. 小麦籽粒中各种糖含量的测定 取 20×38 滤纸一张,以相同的间隔作五个记号。于记号上分别点上一一定体积的样品溶液,按上述方法进行层析。展层后,除尽溶剂,剪下二边二个样品的滤纸条,以苯胺-二苯胺-磷酸显色剂显色,确定各种糖层析后在滤纸上的部位。以此二滤纸条作参照,在未显色滤纸的相应部位剪下各种糖类的纸块,同时在附近剪下同样大小的空白滤纸片作测定时的对照用。剪下的滤纸放在试管中,加入 2 毫升水,室温抽提二小时后经烧结玻璃漏斗过滤,滤液中加 4 毫升蒽酮试剂,沸水浴加热 15 分钟,冷却后在波长 620nm 处读取 OD 值。在标准曲线上查取含糖量,根据各种糖的量分别

计算出小麦籽粒中各类糖所占的百分比。

5. 糖定量测定标准曲线的制作 见“苹果中糖类的分离鉴定及定量测定”中苹果抽提液中糖的定量测定部分。

参 考 资 料

- [1] 李正智, 植物生理通讯, **5**, 45, (1965)。
- [2] Nolson, N., *J. Biol. Chem.*, **153**, 375, (1944)。
- [3] Somogyi, M., *J. Biol. Chem.*, **195**, 19, (1952)。
- [4] King, E. J., *Microanalysis in Medical Chemistry*, p. 20, (1946)。
- [5] Wootton, Ian. David., *Micro-Analysis in Medical Biochemistry*, p. 94—98, (1964)。
- [6] 藤井暢三, 生化学実験法(定量篇), p. 391, (1964)。
- [7] 别洛杰尔斯基著, 吴相钰译, 植物生物化学实验指导, 12—14, 25—26 页, (1956), 高等教育出版社。
- [8] 福州部队总医院编, 临床医学检验, 280 页, (1977)。
- [9] An, J., *Med. Tech.*, **31**, 17, (1965)。
- [10] Egon Stahl, *Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook*, p. 807, (1969)。
- [11] 应用微生物展览会资料, 酶制剂的生产和测定方法, 98 页, (1971)。
- [12] 邹庆华等, 植物生理通讯, **3**, 45, (1964)。
- [13] Randle, J. M., *J. Biochem.*, **61**, 586, (1955)。
- [14] Запрёмтова, М. Н., *Биохимические Методы Анализа Растений*, p. 74—110 (1960)。

第二章 脂 质 类

赵志安 蔡武城

脂质类广泛存在于生物体，其共同的物理特性是不易溶于水，而易溶于脂溶性溶剂。但它们之间在结构上和功能上有明显的差别。

根据化学组成，脂质类可分为：中性脂肪，例如油和脂；类脂质，例如磷脂、固醇和蜡；以及它们的水解产物，包括脂肪酸、脂肪族的高分子醇及固醇。

脂质类具有重要的生理功能，脂肪在生物体内主要起着氧化供能的作用；类脂是生物膜的主要组份之一，约占膜重量的一半左右或更多，它与细胞膜的各种功能例如通透性等有着密切关系；脂蛋白是由甘油三酯、胆固醇、磷脂和蛋白质所组成的复合蛋白，在心血管疾病的研究方面具有重要意义。

本章介绍脂质类的定性和定量测定，绝大多数已在工农医各部门使用。内容主要包括脂肪某些化学性质的测定；几项血脂成份的分析测定等。

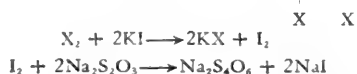
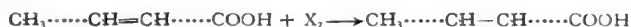
第一节 脂肪化学性质的测定

一、碘 值^[1-3]

原理

利用脂肪与卤素的加成反应可以测定油脂的不饱和程度。每 100 克脂肪，在一定条件下，所吸收的碘的克数，称为该脂肪的碘值。碘值愈大，表示脂肪的不饱和程度愈大。

测定碘值的方法很多，多数方法应用以下原理：把含脂肪样品溶入惰性溶剂，加入过量卤素或卤素本身的化合物（例如氯化碘等）标准溶液，使卤素起加成反应，但不使卤素取代脂肪酸中的氢原子。通常再加碘化钾，使与未起反应的卤素作用，以硫代硫酸钠滴定释放出的碘而定量之。例如：



为了定量地进行加成反应，并避免取代反应，反应应该在较低的温度下进行，还需用适当的溶剂例如冰醋酸、三氯甲烷等稀释，使适当降低反应物的浓度。

这里介绍氯化碘-醋酸溶液法，这是目前应用比较广泛的测定方法。它的优点是溶液配好后即可以使用，浓度的改变小；操作所花的时间短。

试剂

1. 氯仿或四氯化碳 (A. R.)

2. 氯化碘-醋酸溶液: 称取 13 克升华碘片, 溶于 1000 毫升冰醋酸中, 置水浴锅上微热, 至碘片完全溶解。冷却, 倾出 200 毫升, 其余通入洁净而干燥的氯气(使氯气通过水洗瓶及硫酸洗气瓶), 至游离碘色消失而呈桔红色为止。如通入氯气过量, 颜色太淡, 可倾入事先取出的碘液, 使它的浓度达到硫代硫酸钠滴定时所用的量为不通氯气时的 2 倍。氯化碘-醋酸溶液中不能有多余的游离氯。

上述配制用的冰醋酸不得含有还原性物质。醋酸精制方法: 每 800 毫升冰醋酸加 8—10 克高锰酸钾, 移入圆底烧瓶, 装上迴流冷凝管, 加热迴流。静止至氧化完全, 移入蒸馏瓶进行蒸馏, 接取 118—119℃ 的馏出液。

冰醋酸的还原性检查试验——取 2 毫升冰醋酸, 加 10 毫升 0.1N 高锰酸钾溶液, 所产生的粉红色不得在 2 小时内完全褪去。另一方法为取 10 毫升冰醋酸, 加入含有 0.05 毫升重铬酸钾饱和溶液的浓硫酸(比重 1.84) 10 毫升, 混匀后应立即产生绿色。

3. 15% 碘化钾溶液: 称取 15 克碘化钾溶于蒸馏水, 稀释至 100 毫升。

4. 1% 淀粉溶液: 称取可溶性淀粉 1 克, 加入少量蒸馏水调成薄浆, 把它倾入 100 毫升沸水中, 迅速搅拌放冷。可加入少量苯甲酸钠或水杨酸(每毫升 1.25 毫克)防腐。

5. 0.1N 硫代硫酸钠溶液 称取 26 克硫代硫酸钠及 0.2 克无水碳酸钠, 加约 1000 毫升水, 煮沸 10 分钟, 冷却, 定容至 1000 毫升。贮存于棕色瓶中, 放置二周后过滤标定备用。

标定方法 称取 110℃ 烘至恒重的基准重铬酸钾 0.2 克, 精确至 0.0002 克, 溶于 250 毫升煮沸并冷却的水中, 加 2 克碘化钾及 20 毫升 4N 硫酸, 待碘化钾溶解后, 于暗处放置 10 分钟, 定容至 500 毫升后, 用 0.1N 硫代硫酸钠溶液滴定, 近终点时加 3 毫升 0.5% 淀粉溶液, 继续滴定至溶液由蓝色转变为亮绿色。同时作空白试验。

硫代硫酸钠标准液的当量浓度 N 按下式计算:

$$N = \frac{G}{V \times 0.04903}$$

式中: G 为重铬酸钾的重量(克), V 为硫代硫酸钠溶液的用量(毫升), 0.04903 为每毫克当量重铬酸钾的克数。

操作步骤

按表 2.1 所示值称取油量, (准确至 0.0002 克)置于 250 毫升干燥而清洁的碘价瓶中(同时作空白试验), 加 10 毫升四氯化碳(或氯仿), 立即振荡使油样充分溶解, 混匀, 然后由滴定管精确加入 25 毫升氯化碘-冰醋酸溶液。(放入速度掌握在 2 分钟左右, 不宜太快, 每次速度要一致。)盖紧瓶塞, 摇匀后, 置暗处(20℃ 左右)放置 30 分钟(碘值在 130 以上应放置 60 分钟), 促使加成反应完全。加入 15% 碘化钾溶液 20 毫升和 100 毫升水。在不断振荡下, 用 0.1N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准溶液滴定, 当溶液由棕红色变成淡黄色时; 加入 1 毫升 1% 淀粉溶液, 再继续滴定至蓝色消失为止。记录样品和空白试验所消耗的 0.1N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的毫升数。

计算

$$\text{碘值} = \frac{(V_2 - V_1) \times N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times 0.01296}{W} \times 100$$

式中, V_1 为滴定样品所耗用 0.1N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的毫升数, V_2 为滴定空白所耗用 0.1N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的毫升数, W 为样品的重量(克), 0.01296 为消耗每毫克当量 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 换算成碘的克数。

表 2.1 称 量 表

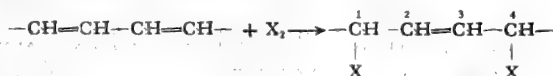
碘 值	试 验 重 量 (克)	碘 值	试 验 重 量 (克)
20 以下	1.2000—1.2200	100—120	0.2300—0.2500
20—40	0.7000—0.7200	120—140	0.1900—0.2100
40—60	0.4700—0.4900	140—160	0.1700—0.1900
60—80	0.3500—0.3700	160—180	0.1500—0.1700
80—100	0.2800—0.3000	180—200	0.1400—0.1600

讨论

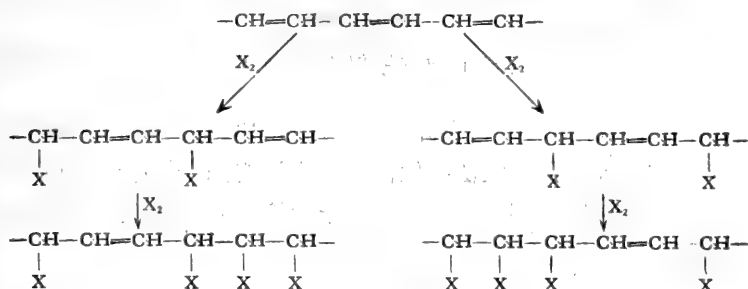
(1) 为了得到正确的测定结果,在操作过程中要注意:样品的称取量不能超过表中的最高数量;光和水份对氯化碘会起作用,因此所用仪器必须洗净烘干,氯化碘-醋酸溶液应用棕色瓶盛装,并在暗处保存;氯化碘-醋酸溶液的滴加速度同一试验必须一致;必须严格控制溶液的浓度和作用时间。

(2) 卤素的加成反应与双键的位置和排列等有关。在有 2 个或更多双键的不饱和脂肪酸(多烯酸)时,同样可以起卤素的加成反应,而双键位置的影响更为显著。

共轭双键的卤素加成反应常是加成在第一个和第四个碳原子上,即“1,4 加成”。



含有三个双键的共轭化合物,一般也是按照“1,4 加成”的规律进行:



从上述反应可以看出,含有三个双键的共轭化合物,不是每个双键上都加成卤素,而是只加成了三分之二。从而可以说明,用一般测定碘值的方法测定桐油时所得的碘值只是接近于桐酸全部加成的三分之二。(如用氢化法测得桐油的碘值为 240 时,用氯化碘-醋酸法测定时则为 166。)

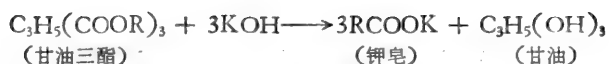
一些油脂的碘值参见(表 2.2)。

二、皂 化 值^[2,3]

原理

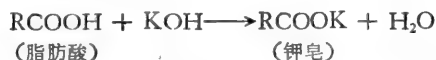
皂化值就是水解 1 克脂肪所需要氢氧化钾的毫克数。

用碱水解脂肪时,分解出来的脂肪酸即与碱中和生成脂肪酸的盐。这种作用称为皂化作用。



由此反应式可见,每皂化 1 克分子的脂肪,需要 3 克分子的氢氧化钾。因此由皂化值大小可以估计试样的平均分子量。试样组份(甘油三酯或脂肪酸)的平均分子量愈大,皂化值愈小;反之,平均分子量小,则皂化值愈大。脂肪的分子量决定于构成它的脂肪酸的碳链的长短。所以,由长碳链脂肪酸构成的脂肪,皂化值小;短碳链脂肪酸构成的脂肪,皂化值大。

脂肪酸的皂化反应按下式进行:



所以,1 克分子氢氧化钾可以皂化 1 克分子脂肪酸,从而也可以求得脂肪酸的平均分子量。

试剂

1. 70% 中性乙醇溶液 在温热的 70% 乙醇中加酚酞指示剂数滴,以 0.1N 氢氧化钾中和。

2. 1% 酚酞指示剂 称取 0.5 克酚酞溶于 95% 乙醇 50 毫升中。

3. 0.5N 盐酸标准溶液 取比重 1.19 盐酸 45 毫升,加水至 1000 毫升。

标定方法 称取恒重的无水碳酸钠,0.5—0.8 克(准确至 0.0002 克)于 250 毫升三角瓶中;加 50 毫升水溶解,滴加 2 滴 0.1% 甲基橙指示剂,用盐酸标准溶液滴至橙色。

$$N = \frac{W}{V \times 0.053}$$

式中, W 为称取的碳酸钠的克数, V 为滴定所耗用的盐酸标准溶液的毫升数, 0.053 为碳酸钠的毫克当量数, N 为所配的盐酸溶液实际当量浓度。

4. 0.5N 氢氧化钾乙醇溶液 分析纯氢氧化钾 30 克,溶于 1 升精馏乙醇(95%)中,振荡均匀,静置 24 小时,用虹吸法或倾出上层澄清液,以移去不溶性碳酸盐。溶液贮存于玻璃瓶中,接以装有苏打石灰的球管(球形干燥管),以防止吸收空气中的二氧化碳。(溶液应在长时间内保持无色。)

精馏乙醇的方法 硝酸银 2 克,加 3 毫升水溶解,注入 1 升乙醇中剧烈振荡,另取氢氧化钠 3 克,溶于 15 毫升热乙醇中,冷却后加入上述液体中,静置 1—2 周,待澄清后吸取清液蒸馏。

操作步骤

称取混匀过滤的油样 2 克(准确至 0.001 克)于 250 毫升三角瓶中,由滴定管放入 0.5N 氢氧化钾乙醇液 25 毫升。连接迴流冷凝器,在水浴或电热板上煮沸 30 分钟,并随时摇动,至样品完全皂化为止。取下迴流冷凝器,加 10 毫升中性乙醇和 3—4 滴酚酞指示剂,趁热立即以 0.5N 盐酸标准液滴定至终点。记录其耗量。同时作两份空白试验。

计算

$$\text{皂化价} = \frac{(V_2 - V_1) \times N \times 56.11}{W}$$

式中: V_2 和 V_1 分别为样品和空白试验所耗用的盐酸标准液的毫升数, N 为盐酸标准液的当量浓度, W 为样品的重量(克)。

讨论

(1) 天然油脂是各种甘油脂的混合物,含有多种脂肪酸。其皂化价一般在 190—200 之间,但也有少数脂肪含有大量短碳链脂肪酸而显示较高的皂化值。如椰子油为 253; 奶油为 227; 相反,含长碳链脂肪酸多的脂肪则显示较低的皂化值,如菜籽油为 173, 芥籽油为 174。某些油脂的皂化值见表 2.2。

表 2.2 一些油脂的皂化值和碘值

油脂名称	皂化值	碘值	油脂名称	皂化值	碘值
椰子油	250—260	8—10	花生油	185—195	83—93
奶油	216—235	26—45	棉籽油	191—196	103—115
猪油	193—200	46—66	豆油	189—194	124—136
牛油	190—200	31—47	亚麻油	189—196	170—204
蓖麻油	176—187	81—90	桐油	189—195	

(2) 当脂肪与氢氧化钾乙醇液共热时,部分脂肪酸可以与乙醇作用形成乙酯而不参与皂化,因此得出的皂化值会偏低,但这种误差对一般脂肪来说尚不严重。

(3) 操作过程中尚须注意以下几点: 滴定时不可加水,以免肥皂水解,使皂化值降低。皂化完毕后,须趁热尽快进行滴定,以免溶剂吸收二氧化碳而影响结果。滴定时不宜用硫酸代替盐酸,因为硫酸与氢氧化钾生成的硫酸钾的溶解度比氯化钾差,常因此而沉淀,影响终点的观察。皂化所得溶液如果颜色太深,酚酞指示剂不能观察到正确的终点时,可改用碱性蓝 6B, 百里酚。(配制方法见“酸值”部分)

三、不皂化值^[2]

原理

不皂化物是油脂和蜡的组份之一。它不溶于水,而且不会因为碱的作用而变为水溶性化合物。不皂化物包括高级醇类(包括甾醇)、脂溶性维生素 A、D、E, 胡萝卜素和烃类。油脂的不皂化物含量是鉴定品质的条件之一。对某些油脂来说,也可以看作一种特性常数,如鲨鱼肝油的不皂化物含量高达 50—80%。

测定不皂化物方法很多。多数方法是先用碱液将样品皂化后,再用有机溶剂萃取不皂化物,蒸去有机溶剂后,即得不皂化物。

试剂

1. 乙醚 (A. R.)
2. 丙酮 (A. R.)
3. 新鲜煮沸的 95% 中性乙醇
4. 0.1N 氢氧化钠乙醇溶液 称取 4 克氢氧化钠溶于 1000 毫升乙醇溶液中。
5. 0.5N 氢氧化钾乙醇溶液 (配法同皂化值部分)。
6. 酚酞指示剂 (配法同皂化值部分)。
7. 0.5N 氢氧化钾水溶液

操作步骤

精确称取 2.000 克左右试样,置于 250 毫升三角瓶中,加入 25 毫升 0.5N 氢氧化钾乙醇溶液。连接空气冷凝管,在水浴上皂化 1 小时,并不时振荡,使皂化完全。

皂化完毕后,将三角瓶内容物移入 250 毫升分液漏斗中,加 50 毫升水洗涤,用乙醚冲洗三角瓶,把乙醚倾入分液漏斗,趁内容物稍呈温热(30℃)加塞猛烈振荡,静置待分层后,把下面的水层从下面放入皂化时用的三角瓶中。

乙醚层则从分液漏斗上方口里倾入盛有 20 毫升水的 250 毫升分液漏斗中。水层再用乙醚萃取如前,(每次用 50 毫升),共萃取三次。萃取的乙醚都合并在第二个分液漏斗中。如乙醚萃取物中含有固体悬浮物,用不含油脂的干燥小滤纸过滤入另一分液漏斗,并用乙醚洗净滤纸。

用 20 毫升水洗涤乙醚萃取液,(不要剧烈振荡)待分层后弃去水层。然后依次用 20 毫升 0.5N 氢氧化钾水溶液和 20 毫升水重复洗涤三次,最后用水洗涤到以酚酞指示剂试验时洗涤液不呈淡红色为止。

把乙醚萃取液移入已知重量的烧瓶中,蒸去大部分乙醚后,加入 2—3 毫升丙酮。斜持烧瓶,浸入沸水浴中,以完全除去溶剂。在不超过 80℃ 的条件下把烧瓶和内容物烘干至恒重(称量精确至万分之二)。

把烧瓶内容物溶于 10 毫升新鲜煮沸的 95% 中性乙醇中,用 0.1N 氢氧化钠乙醇溶液滴定,以酚酞为指示剂。

如果上述的滴定不超过 0.1 毫升,则按下式计算不皂化物含量的百分率:

$$\text{不皂化物}\% = \frac{A - B}{W} \times 100$$

式中, A 为烧瓶和内容物的重量(克), B 为烧瓶的重量(克)。 W 为试样的重量(克)。

如果上述的滴定超过 0.1 毫升,则应另取试样重做。

讨论

(1) 选择什么有机溶剂萃取不皂化物很重要。通常选用乙醚和石油醚。但石油醚往往不能把不皂化物完全萃取出来,使一般动物油脂所测得的不皂化值结果常偏低。目前看来,乙醚萃取法仍是比较好的方法。

(2) 在操作步骤中尚需注意以下几点:所用的试剂必须不含不皂化物,在 80℃ 时的不挥发物不能超过下列限量——乙醇不超过 0.002%,乙醚不超过 0.001%,丙酮不超过 0.01%;所用的分液漏斗的活塞上,最好不涂凡士林等润滑剂,如涂有这种润滑剂,必须严密防止溶入乙醚;在从分液漏斗中取出乙醚层时,不可从活塞放出,应该从它的口上倾出。过滤用的滤纸可选用乙醚充分洗涤过的普通滤纸。在最初用乙醚萃取时,内容物是温热的,必须注意放气,以免乙醚冲出;同时此刻溶液的碱性相当强,可能形成乳浊层,可以滴加几滴 1N 盐酸,使分层清晰。

(3) 在稀的皂液中,常因肥皂水解而使脂肪酸溶入乙醚层。虽然乙醚层反复用氢氧化钾溶液洗涤,使脂肪酸皂化,再用水洗去,但是残留的脂肪酸还是有的。所以最后称得不皂化物后,必须用乙醇溶解不皂化物,测定它的酸度。如果在中和时超过 0.1 毫升 0.1N

氢氧化钠乙醇溶液(约相当于 0.11% 游离脂肪酸或更大一些的酸性肥皂),须另取新试样重做。

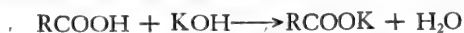
(4) 不皂化物含量高的试样,难以皂化完全,除可考虑延长皂化时间外,可把试样重量减小到 0.5 克,并可把萃出的不皂化物重复皂化,萃取和洗涤等和前面的操作一样。

(5) 一般油脂的不皂化物含量在 1—2%,但某些油脂的不皂化物含量很高,如鲨鱼肝油中含 50—80%,蜂蜡中含 45—56%,羊毛蜡中含 39—55%。

四、酸 值

原理

脂肪中游离脂肪酸含量的情况,常用“酸值”表示。所谓酸值或酸价就是中和 1 克样品中游离脂肪酸所需要的氢氧化钾的毫克数。



油脂的游离脂肪酸含量的多少,是油脂品质好坏,精炼程度的重要标准之一。一般以游离脂肪酸含量低为佳。

试剂

1. 0.1N 氢氧化钾溶液 称取 6 克氢氧化钾 (A. R.), 溶于蒸馏水中, 定容至 1000 毫升。

标定方法 称取 0.5 克(准确至 0.0002 克)恒重的邻苯二甲酸氢钾, 于 150 毫升三角瓶中, 加 30 毫升水, 酚酞 2—3 滴, 用所配制的氢氧化钾溶液滴定至微红色。

$$N = \frac{B}{A \times 204.1 \times 1000}$$

式中, A 为标定中所耗用的氢氧化钾溶液毫升数, B 为邻苯二甲酸氢钾的重量(克)。

2. 乙醇 苯混合液 (1:1, V/V): 等体积无水乙醇和苯混和后, 用碱液滴定至中性。

3. 酚酞指示剂 称取 1 克酚酞溶于 100 毫升 75% 乙醇溶液中。

操作步骤

精确称取油样 3—5 克(准确至 0.001 克)置于 150 毫升三角瓶中, 加入 50 毫升乙醇: 苯混合液, 摇匀, 使油样充分溶解后, 加入 2—3 滴酚酞指示剂, 然后以 0.1N 氢氧化钾溶液进行滴定, 至微红色 30 秒钟不消失为止。

计算

$$\text{酸值} = \frac{V \times N \times 56.11}{W}$$

式中, V 为滴定时所耗氢氧化钾溶液的毫升数, N 为氢氧化钾溶液的当量浓度, W 为油样的重量(克)。

讨论

(1) 颜色深的试样, 用酚酞作指示剂时, 确定终点有困难, 特别是溶解后的溶液呈红色时, 酚酞指示剂不能显示明确的终点, 这时可以改用碱性蓝 6B 或百里酚(麝香草酚酞),

这两种指示剂的配法和 pH 范围如下:

碱性蓝 6B 指示剂: 配成 2% 的乙醇 (75%) 溶液。变色范围为 pH9.4—14; 酸性则呈蓝色, 碱性则为淡红色。

百里酚指示剂: 配成 1% 的乙醇 (75%) 溶液。变色范围为 pH9.3—10.5; 酸性侧呈蓝色, 碱性侧为蓝色。

(2) 试样的称量视酸值大小或颜色深浅而增减。酸值小, 颜色浅, 试样重量可适当增加 (20—30 克); 酸值大、颜色深的试样, 可适当减少 (1 克)。滴定用的氢氧化钾溶液, 当酸值高时, 可以改用浓度为 0.25N 或 0.5N; 一般以所用氢氧化钾溶液最多不超过 10 毫升为宜。

(3) 所用溶剂, 也可采用乙醚:乙醇混合液 (2:1, V/V), 乙醇等。蜡常不溶于乙醇, 可选用甲醇:甲苯混合液 (1:1, V/V) 或乙醇:石油醚混合液 (1:2, V/V) (沸点为 80℃ 的石油醚)。不论用哪一种溶剂, 都要中和至中性才能使用。

第二节 粗脂肪的定量测定^[2,3]

原理

脂肪类化合物一般都溶于有机溶剂, 如乙醚、石油醚、苯及氯仿等, 不溶于水或微溶于水。利用此特性, 以索氏提取器 (图 2.1) 用乙醚抽提出样品中的脂肪, 然后将乙醚蒸发, 称取瓶中残留物的重量, 即可得到样品中所含脂肪的量。

用本法提取的物质除中性脂肪外, 还含有游离脂肪酸、蜡、磷脂、固醇及色素等脂溶性物质, 故称粗脂肪。

试剂

乙醚 乙醚试剂中不能含有过氧化物、乙醇及水份。

去过氧化物的处理 将乙醚装入分液漏斗, 加入乙醚量 1/5 的 10% 硫酸亚铁 (100 克硫酸亚铁溶于 600 毫升水中, 再加 30 毫升浓硫酸酸化, 并稀释至 1000 毫升), 充分混和后, 澄清分层, 放出水液。过氧化物鉴定法: 6 毫升乙醚于试管中, 加 2 毫升 10% 碘化钾溶液, 猛烈混合, 放置 1 分钟, 下层碘化钾呈黄色, 即表示有过氧化物存在。

去乙醇的处理 加乙醚量 1/5 的 10% 氢氧化钾溶液洗涤, 洗后放出水溶液, 重复 2—3 次。

去水份的处理 在乙醚瓶中加入适量细粒无水氯化钙, 放置一昼夜, 时加摇荡, 将上层清液移入蒸馏瓶中蒸馏。

操作步骤

从平均样品中分取试样, 拣去杂质, 用感量 0.1 毫克的天平准确称取 2—4 克, 105℃ 烘箱内烘 1 小时, 取出在干燥器内冷却至室温, 然后加入研钵内研细。(芝麻、蓖麻籽、花生仁在研磨时可以加适量石英砂助研), 用角匙将研细的试样移入已烘过的滤纸筒 (或滤纸包) 内, 并取少量脱脂棉花蘸乙醚抹净研钵和研锤及角匙上的试样的油迹, 一并投入滤纸筒 (包) 内。在试样层面塞以脱脂棉花, 将滤纸筒 (包) 放入抽提管内。然后在已烘至恒重的洁净抽提瓶内, 加入约瓶体 1/2 的无水乙醚, 再把抽提器各部分连接起来, 打开冷凝管水流, 在预先加热至 75℃ 左右的恒温水

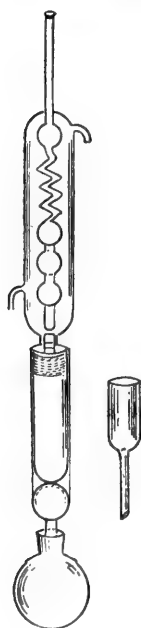


图 2.1 索氏提取器

浴锅上进行加热(或用 75W 电灯加热)。在抽提过程中,应保持恒温,使抽提管中乙醚以每分钟回流 150 滴的速度进行。抽提时间按样品中含油量多少而定。含油量较低的(30%)油料,一般抽提 8—10 个小时,含油量较高的应增加抽提时间。抽提的完全与否,可将抽提管内乙醚用滤纸试验无油迹为标准。

抽提完后,卸开抽提管,取出滤纸筒,再接好抽提器,继续回流,使乙醚循环一次,以洗净残留在提取器上的脂肪。然后卸开抽提管,将乙醚蒸出(回收)。在蒸发完毕时,将提取瓶倾斜于水浴中继续蒸干,最后用纱布蘸乙醇擦洗洗净抽提瓶外壁,再将瓶放入烘箱内进行烘干,直至前后两次烘后重量之差小于 0.2 毫克为止。提取瓶增加的重量即为油脂的重量。

$$\text{含油量}\% = \frac{\text{油脂重量(克)}}{\text{试样重量(克)}} \times 100$$

讨论

(1) 试样处理:

小粒油料——如芝麻、油菜籽、亚麻籽等分取试样 20 克,装入磨口瓶备用。

大粒油料——如大豆、花生仁等。分取试样 30 克,拣出杂质,大豆用磨粉法磨细,通过 10 毫米筛孔;花生仁剪碎或切碎装入瓶内备用。

带壳油料——如花生果、葵花籽等。取样 30 克,逐粒剥开,分别称重,计算出仁率;再将籽仁剪碎或切碎装入瓶内备用。

(2) 样品研磨后转移到滤纸筒后,研钵和研锤及角匙上的油迹一定要用乙醚擦出,并转移至滤纸筒内,否则会严重影响结果。

(3) 一般用沸点在 60℃ 以下的有机溶剂提取。乙醚提取的数值一般偏高,因有些非脂肪物质也被提取;而石油醚提取时,对真脂具有更大的选择性提取。

第三节 血清中脂质类的测定

一、血清 β -脂蛋白^[4]

原理

在 pH 中性条件下,血清中的 β -脂蛋白可与多价阴离子溶液(例如肝素、硫酸右旋糖酐等硫酸多糖类)生成复合物,当加入二价阳离子(锰或钙)时,即产生不溶性复合物,由此形成混浊度。于波长 600nm 比色测定,可求得其含量。

试剂

1. 0.025M 氯化钙溶液 2.725 克无水氯化钙加蒸馏水至 1000 毫升。

2. 肝素溶液 浓度为每毫升 200 单位。具体配制时根据所取试剂每毫克单位含量折算。例如:若标号为每毫克 125 单位,则取 4 毫克配成 2.5 毫升即可。

3. β -脂蛋白的制备 取健康人血清(胆固醇和甘油三酯在正常范围内)8 毫升于 500 毫升三角瓶中,加 0.025M 氯化钙 480 毫升,摇匀后加肝素溶液(200 单位/毫升)8 毫

升,即刻混浊,使充分摇匀,然后置冰箱过夜。次晨倾去上层清液,把沉淀物倒入试管,3000 转/分离心,小心吸去上层清液后,倒置试管于滤纸上,尽量吸去管内残余清液,最后把试管移置于氯化钙干燥器中,待干燥恒重后备用。

操作步骤

1. 标准曲线的制作 称取 β -脂蛋白复合物 5 毫克,于小研钵中,加 0.025M 氯化钙溶液 0.5 毫升,用磨砂玻璃杆研磨成均匀悬液,再逐滴加入 0.025M 氯化钙溶液 4.5 毫升,继续研磨悬液成乳浊状。

吸取上述标准液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.2 毫升(各相当于每 100 毫升血清中含有 β -脂蛋白 200、400、600、800 和 1200 毫克),分别于各试管中,随即加 0.025M 氯化钙溶液,补足体积到 4.2 毫升。摇匀,置室温 (25℃) 30 分钟后,于 600nm 测定光密度,以水作空白,读取各管的光密度读数,于坐标纸上绘制成标准曲线。

2. 样品的测定 取血清 0.1 毫升,加 0.025M 氯化钙溶液 4 毫升,再加肝素溶液 0.1 毫升,摇匀,置室温 (25℃) 30 分钟后,按上述操作法比色,得光密度值。查标准曲线求得 β -脂蛋白含量。

讨论

(1) 本法用钙离子和肝素对 β -脂蛋白和前 β -脂蛋白起浊度沉淀反应,所以当浊度增高时,必伴有胆固醇或甘油三酯含量的增加。由于方法简单快速,故可用于临床,作为高脂血症一项预测指标。

(2) β -脂蛋白浊度与反应时间、温度有关系。测定时加入肝素溶液即起浊度反应,如果按不同时间读取光密度,可观察到,每隔 5 分钟光密度上升 0.01,自 25 分钟到 60 分钟则稳定成一直线,所以一般选用 25—60 分钟内进行测定。

测试样品恒温于 15—25℃ 内,光密度值较稳定,高于 25℃ 时,光密度升高 0.02; 低于 15℃ 时光密度降低 0.02。所以控制温度在 15—25℃ 范围内,测定结果比较稳定。

二、血清胆固醇^[5,6]

(一) 邻苯二甲醛法

原理

临床胆固醇分析的呈色反应,主要应用类固醇在硫酸中的氧化缩合反应,但用于测定血清中胆固醇时,会受到血清中蛋白质和胆红素等的干扰。Zlatkis 探讨了四十余种芳香醛与血清中胆固醇的反应,指出邻苯二甲醛和胆固醇的反应具有敏感度强、特异性及稳定性好的优点,可以应用于血清胆固醇的直接测定。作用原理还不清楚。

试剂

1. 邻苯二甲醛贮存液 (100 毫克/100 毫升) 称取邻苯二甲醛 (*O*-phthaldialdehyde) 500 毫克溶于 500 毫升冰醋酸中,棕色瓶贮存,室温暗处保存可稳定数月。

2. 邻苯二甲醛应用液 (20 毫克/100 毫升) 吸取贮存液 100 毫升,加乙酸乙酯

100 毫升,无水乙醇 100 毫升,最后以冰醋酸稀释至 500 毫升,置棕色瓶,冰箱保存,可用一个月。

3. 胆固醇标准溶液(200 毫克/100 毫升) 精确称取胆固醇 200 毫克,置于 100 毫升容量瓶中,加入无水乙醇溶解,并定容至刻度,冰箱保存。

4. 浓硫酸 (A. R.)

操作步骤

依次按下表次序操作:

试 剂	标 准 管	测 定 管	空 白 管
邻苯二甲醛应用液	2.5 毫升	2.5 毫升	2.5 毫升
血清样品	—	0.02 毫升	—
胆固醇标准液	0.02 毫升	—	—
混 合 均 匀			
浓硫酸	1.0 毫升	1.0 毫升	1.0 毫升

轻轻地摇匀,5 分钟后,以空白管校正“零”点,于波长 550nm 比色,读取光密度。

计算

$$\frac{\text{测定管光密度}}{\text{标准管光密度}} \times 0.04 \times \frac{100}{0.02} = \text{毫克\%胆固醇}$$

讨论

(1) 本法胆固醇含量在 400 毫克%以内和光密度呈良好线性关系。

(2) 本法血清用量极微,方法灵敏,因此样品及标准液吸取时必须准确,一般采用血色素吸管吸取后,用滤纸将吸管头外壁揩清,把吸管头伸入试管内已加好的邻苯二甲醛应用液中,放出样品即可。

(3) 当室温过低时,可把加好邻苯二甲醛和样品的试管置 37℃ 水浴中预热数分钟,然后取出同上操作。

(4) 硫酸对显色深浅影响很大,加入硫酸愈多,显色愈深。由于浓硫酸粘度大,所以各管加时速度要一致,以保证准确。浓硫酸吸水性强,因此每次测定要同时做标准管的测定。

(5) 本法显色峰波长为 552nm,当加入浓硫酸轻轻摇匀 3—5 分钟时,光密度值可达最高值,15 分钟内不变,30 分钟时光密度平均为原来的 98%,1 小时后平均为原来的 95% 以上。测定管的稳定性比标准管更好些,因此当样品多时,可先将标准管比色。

(6) 血清用量可以增加至 0.025 毫升,而试剂加量不变,对结果无影响。在此范围内,血清蛋白,胆红素在 10 毫克%以下的黄疸血清(胆红素过高时可将标本稀释后测定)和轻度溶血样品对测定无干扰。

(二) 改良 Abell 氏法

原理

血清用碱性乙醇液皂化,使其中胆固醇酯水解为游离胆固醇,然后用石油醚抽提总胆固醇,取石油醚抽提液于适宜的温度蒸干后,溶于去醛冰醋酸中,最后以三氯化铁、硫酸及冰醋酸溶液反应显色。

试剂

1. 无水乙醇 (A. R.)
2. 石油醚 (A. R.) (60—90℃ 馏份)
3. 硫酸 (A. R.)
4. 冰醋酸 (A. R.)
5. 33% 氢氧化钾溶液 称取 33 克氢氧化钾,加水溶解至 100 毫升。
6. 10% 三氯化铁溶液 称取 2.5 克 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于冰醋酸中,最后体积达 25 毫升。
7. 显色应用液 0.1 毫升 10% 三氯化铁溶液加 10 毫升硫酸。临用时配制。
8. 胆固醇标准液(1 毫克/毫升) 精确称取结晶胆固醇 100 毫克,溶于无水乙醇,置 100 毫升容量瓶中至刻度。贮于棕色瓶中,冰箱 4℃ 保存。

操作步骤

1. 标准曲线的制作 取胆固醇标准液(1 毫克/毫升)2 毫升于 50 毫升容量瓶中,加 3 毫升无水乙醇,于 37℃ 保温 1 小时,取出后加水 5 毫升,石油醚 10 毫升,充分摇匀置室温数分钟,待分成二层后,取上层清液 0.25、0.50、0.75、1.0 及 1.5 毫升(分别相当于血清中胆固醇含量为 50、100、150、200 和 300 毫克/100 毫升)分别放入各试管,于 60—70℃ 水浴蒸干,取出各加冰醋酸 3 毫升,56℃,10 分钟使其全部溶解,加显色剂 2 毫升摇匀,继续作用 10 分钟,冷却后,以空白管作对照,于 540nm 读取各管的光密度值。以胆固醇浓度为横坐标,光密度值为纵坐标制作标准曲线。

2. 样品的测定 吸取 0.2 毫升血清于试管中,边摇边加入无水乙醇 2 毫升,再加 33% 氢氧化钾溶液 0.2 毫升,于 37℃ 水浴中,放置 1 小时,再加 2 毫升蒸馏水,石油醚 4 毫升,充分摇匀,吸取上层清液 2 毫升于另一试管,置 60—70℃ 水浴蒸干,干后加冰醋酸 3 毫升,56℃,10 分钟,充分溶解,再加显色液 2 毫升(1 分钟内沿管壁迅速加入)摇匀,继续作用 10 分钟。取出冷却。以空白管作对照,读取 540nm 的光密度值,结果查标准曲线得胆固醇含量。

讨论

(1) 制作标准曲线的胆固醇最好重结晶纯化。方法如下: 取胆固醇 2 克,溶于 60—70 毫升无水乙醇中,使达饱和,可略加温助溶,过滤后,置冰箱冷却,即可析出结晶,过滤收集胆固醇结晶。必要时可如此重复结晶三次。贮于干燥器内恒重,纯化后产物为洁白色片状晶体。

(2) 冰醋酸要求不含醛类杂质及水份。

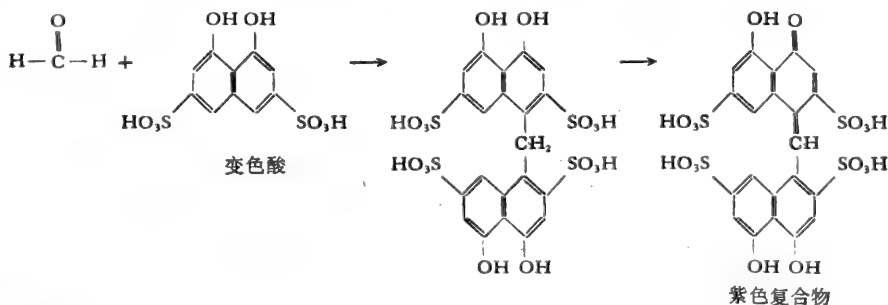
(3) 操作步骤注意点：抽提时必须剧烈振荡 2 分钟，并防止石油醚挥发；显色时，样品、标准及空白都必须保持同一温度，然后加显色剂。

三、血清甘油三酯^[7,8]

(一) 直接法

原理

通过阳离子交换树脂吸附去除血清中的磷脂，然后用氯仿抽提甘油三酯，过滤除去树脂后，取滤液蒸干，再皂化成为脂肪酸和甘油，然后加过碘酸钠氧化甘油使成醛，多余的碘由亚砷酸钠还原而终止氧化。最后加变色酸（4, 5 二羟-2, 7 萘二磺酸），使与醛生成紫色复合物。通过比色测定，求得血清中所含甘油三酯的量。此法已沿用多年，所产生的颜色稳定，灵敏度高。



试剂

1. 氯仿(重蒸)
2. 0.2% 氢氧化钾乙醇溶液 1 克氢氧化钾溶于无水乙醇中至 500 毫升。
3. 无水乙醇
4. 0.2N 硫酸
5. 0.05M 过碘酸钠 1.07 克过碘酸钠加蒸馏水至 100 毫升。
6. 0.5M 亚砷酸钠 2.25 克氢氧化钠和 5 克三氧化二砷，先以少量水溶解，最后加蒸馏水至 100 毫升。
7. 0.2% 变色酸 2 克变色酸溶于 200 毫升水中；另外将 600 毫升浓硫酸缓缓加入 300 毫升水中，边加边搅(在 2000 毫升的大烧杯中进行)，待冷后，取出 800 毫升，加入变色酸溶液，贮存于棕色瓶中。置室温避光可保存 3 个月之久。
8. 国产钠型阳离子树脂 (<200 目。)
9. 去脂滤纸 将滤纸先浸泡于 0.02N 氢氧化钠溶液中，24 小时，冲洗后再调换 0.02N 盐酸溶液浸泡同样时间，最后用 95% 乙醇浸 4 小时，乙醚 2 小时，烘干备用。
10. 甘油三酯标准液
 - (1) 贮存液 250 毫克甘油三酯，用氯仿溶解，并于 50 毫升容量瓶中定容至刻度。浓度为 5 毫克/毫升。
 - (2) 应用液 取贮存液 1 毫升，用氯仿稀释至 100 毫升。浓度为 50 微克/毫升。

操作步骤

1. 样品的测定 取血清 0.25 毫升，加 0.5 毫升生理盐水稀释。摇匀。取树脂 1 克于 50 毫升三角烧瓶中，加氯仿 1 毫升，然后逐滴加入已稀释的血清 0.25 毫升，随加随摇，混和均匀，再加氯仿 3.75 毫升，用力振荡 10 分钟，滤纸过滤，取二个试管各加滤液 1 毫升，于 65—70℃ 水浴蒸干。分别作皂化与未皂化试验。

按下表步骤进行操作

步 骤	皂 化 管	未 皂 化 管
0.2% 氢氧化钾乙醇溶液(毫升)	0.5	—
无水乙醇(毫升)	—	0.5
混匀，放入 60—70℃，水浴 15 分钟		
0.2N 硫酸(毫升)	0.5	0.5
放入沸水浴中 5 分钟，取出冷水冷却		
0.05M 过碘酸钠(毫升)	0.1	0.1
旋转管底，使均匀接触，充分氧化 10 分钟		
0.5M 亚砷酸钠(毫升)	0.1	0.1
呈黄色后转变为无色，停止反应		
0.2% 变色酸(毫升)	5.0	5.0

于沸水浴中加热 20 分钟，呈紫色复合物，冷却后，以未皂化管作为对照，校正“零”点，读取 570 毫微米的光密度值，并于标准曲线上查得含量。

2. 标准曲线制作 分别吸取甘油三酯应用液 0.2、0.4、0.6 和 0.8 毫升，于各试管中，并同样重复一组。作皂化与未皂化。各管置水浴蒸干后，测定按上述操作步骤进行。以上各管中甘油三酯的含量为 10、20、30 和 40 微克，相当于血清中甘油三酯含量为 60、120、180 和 240 毫克%。读取各管的光密度值，并于坐标纸上绘制标准曲线。

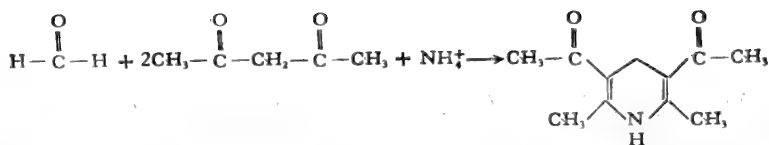
讨论

操作步骤注意点：血清与树脂的接触面一定要分散，使树脂能充分吸附磷脂。氯仿抽提时要充分振摇，并且滤液一定要蒸干。配制变色酸浓度为 0.2%，如果浓度高于或低于此值，显色将受影响。在反应中，硫酸浓度对反应速度影响很大。显色反应于 100℃ 水浴 30 分钟已达高峰。

(二) 快速法

原理

血清中甘油三酯用正壬烷/异丙醇混合溶剂抽提，经皂化为甘油及脂肪酸。以过碘酸钠氧化甘油生成甲醛，甲醛与乙酰丙酮反应生成黄色的 3，5-二乙酰-1，4-二氢二甲基吡啶 (3，5-diacetyl-1，4-dihyrolutidine)。于波长 420 毫微米比色，即可测得血清中甘油三酯的含量。



乙酰丙酮 3, 5-二乙酰-1, 4-二氢-2-甲基吡啶

试剂

1. 正壬烷/异丙醇混合液 (2:3.5V/V)。
取正壬烷 20 毫升加异丙醇 35 毫升混合, 置棕色瓶中。
2. 0.04M 硫酸溶液
3. 皂化试剂 称取氢氧化钾(A. R.) 2.5 克, 于 50 毫升蒸馏水中溶解后, 加异丙醇 500 毫升, 置棕色瓶内。
4. 氧化试剂 称取无水醋酸铵 77 克, 溶于 700 毫升蒸馏水中, 加冰醋酸 (A. R.) 60 毫升, 过碘酸钠 1 克, 最后加蒸馏水至 1000 毫升。
5. 显色剂 乙酰丙酮 2 毫升加入 500 毫升异丙醇混匀, 置棕色瓶中。
6. 甘油三酯标准贮存液 准确称取三油酸甘油酯 1.0 克于 100 毫升容量瓶内, 加正壬烷/异丙醇混合液至刻度。浓度为 1 毫升中含 10 毫克。放冰箱保存。
7. 甘油三酯标准应用液 将上述贮存液用正壬烷/异丙醇混合液稀释 10 倍, 浓度为 1 毫克/毫升。

操作步骤

按下表进行:

步 骤	空 白 管 (B)	标 准 管 (S)	样 品 管 (u)
血清(毫升)	—	—	0.2
甘油三酯标准应用液(毫升)	—	0.2	—
蒸馏水(毫升)	0.2	0.2	—
正壬烷/异丙醇混合液(毫升)	2.2	2.0	2.2
0.04M 硫酸(毫升)	0.4	0.4	0.4

剧烈振摇 30 秒, 静置分层, 另取三个洁净试管, 分别吸取上层清液 0.4 毫升, 加入各管 (防止其他液体流入。) 尽量使吸管壁上液体流尽。然后各管中都加皂化剂 2 毫升, 摇匀, 于 65—70℃ 水浴 3 分钟, 再加氧化剂 1 毫升, 显色剂 2 毫升。充分摇匀, 放置 65—70℃ 水浴中 15 分钟, 取出冷却 15 分钟后, 以空白管作对照, 调节“零”点, 于波长 420nm 比色, 读取光密度。(比色杯应干燥, 以免水份引起浑浊, 影响测定结果。)

计算

$$\frac{\text{样品管读数}}{\text{标准管读数}} \times 100 = \text{血清甘油三酯毫克\%}$$

讨论

(1) 线性关系: 当甘油三酯在 300 毫克 % 以上不符合比尔定律, 如果高浓度的甘油三酯血清, 应以生理盐水适当稀释。

(2) 显色稳定性: 显色后 15—60 分钟内光密度变化不大, 60 分钟后显色不稳定, 15 分钟前显色不完全。

(3) 正壬烷国产(北京化工厂三级试剂)与进口(瑞士 Fluka AG) 的比较: 在其它条件不变下, 所得结果无显著性差异。国产的空白读数较瑞士的为低。目前许多单位用正庚烷代替正壬烷, 但选择性不如后者。

(4) 本法简便, 快速, 干扰因素少, 不受溶血、黄疸影响, 但正壬烷价格较贵。

四、血清脂蛋白电泳

(一) 醋酸纤维薄膜脂蛋白电泳^[9-11]

原理

醋酸纤维薄膜脂蛋白电泳, 以醋酸纤维薄膜为载体, 利用各脂蛋白电泳时移动率的不同, 进行分离。电泳后, 用臭氧使脂蛋白的脂肪酸中的双键氧化, 产生醛基类物质, 再用亚硫酸品红染色, 生成紫红色复合物。从而对各区带颜色的深浅不同而进行鉴别。

第一种方法: (以过氧化钡进行臭氧氧化。)

试剂

(1) 巴比妥缓冲液 (pH8.6, 离子强度 0.075): 称取巴比妥钠 15.458 克和巴比妥 2.768 克溶于 1000 毫升蒸馏水中。

(2) 过氧化钡 (A. R.)。

(3) 浓硫酸 (A. R.)。

(4) 亚硫酸品红染色液: 称取 0.5 克碱性品红溶于 100 毫升沸水中, 冷至 60℃ 左右, 加 1N 盐酸 20 毫升, 待冷至室温, 加偏重亚硫酸钠(钾) 2 克混合, 置冰箱过夜, 次日加活性炭 1 克, 混合过滤, 滤液应为无色, 塞紧瓶口, 置冰箱贮存待用。

(5) 0.1N 盐酸; 0.001N 盐酸。

(6) 0.5% 硝酸 (V/V)。

(7) 浸出液: (1) 二甲亚砜 9 份 + 甲酸 1 份。(2) 0.4N 氢氧化钠溶液。

(8) 透明液: 取冰醋酸 70 毫升加无水乙醇 30 毫升混合。

(9) 液体石蜡。

(10) 醋酸纤维薄膜: 厚度为 0.16—0.20 毫米, 每条长 7 厘米, 阔 2.5 厘米。

操作步骤

(1) 点样: 将醋酸纤维薄膜条浸于巴比妥缓冲液中, 约 15 分钟后取出用滤纸将薄膜上多余的缓冲液吸干。毛面向上, 用血色素吸管将新鲜血清 2—2.5 微升均匀地点加于离膜端约 2 厘米处, 当血清全部渗入膜内后即可电泳。

(2) 电泳: 将加好血清的薄膜翻转, 毛面向下, 置电泳槽支持板上(板上悬挂滤纸 4 层)加血清端置于阴极端, 平衡 5 分钟, 通电, 电压 10—15 伏/厘米, 电流 0.4—0.6 毫安/厘米, 45—60 分钟(区带展开约 2.5—3.0 厘米左右)。取出置于支架上, 在 37℃ 烘箱中烘 30 分钟使干。(或 100℃ 烘箱 10 分钟。)

(3) 臭氧氧化: 将已烘干的膜夹在架上, 置真空干燥器中央, 在缸底放置一培养皿, 皿内盛 5 克过氧化钡, 迅速加入 12 毫升浓硫酸, 立即加盖, 此时干燥器内产生强烈的臭氧雾, 将膜熏约 20—30 分钟, 取出准备染色。(氧化器可根据具体情况选用。氧化要完全, 必要时可加大过氧化钡和浓硫酸用量。)

(4) 染色: 将膜置 0.001N 盐酸浸泡 5—10 分钟, 再移至亚硫酸品红染色液, 浸泡 30—40 分钟, 取出用 0.5% 硝酸洗三次, 每次约 5 分钟, 尽量洗去多余的染色液, 再用 0.1N 盐酸洗一次。

(5) 结果判断: 自阴极端起, 原点为乳糜微粒, 依次为 β -, 前 β -和 α -脂蛋白。

(6) 如欲测各区带百分比, 则可将膜上各条区带分别剪下, 置试管中加浸出液 (1) 2 毫升, 待膜完全溶解后, 在波长为 530nm 比色测定, 计算百分率; 或每管加浸出液 (2) 4 毫升, 放置于沸水浴 15 分钟, 冷却后加冰醋酸 1 毫升后比色测定。

(7) 如欲将薄膜透明化, 可将染色清洗后的薄膜条置于洁净干燥的玻璃板上, 用滤纸压干, 取透明液, 加在膜面上, 但与玻板之间不能有气泡, 放入 70—80℃ 烘箱中约 10—15 分钟后取出, 将透明条剥下, 即成鲜艳而不褪色的脂蛋白薄膜条, 可永久保存。

第二种方法: (以紫外光灯照射进行臭氧氧化。)

试剂

(1) 巴比妥缓冲液 (pH8.6, 离子强度 0.075), 同前。

(2) 5% 三氯乙酸。

(3) 70% 甲醇及无水甲醇。

(4) 0.001N 及 0.1N 盐酸。

(5) 1% 醋酸。

(6) 亚硫酸品红液: (1) 碱性品红 0.4 克, 加蒸馏水 240 毫升, 加温助溶后, 补足蒸馏水至原体积。(2) 10% 亚硫酸钠溶液。(3) 浓盐酸。取 (1) 液 120 毫升, (2) 液 20 毫升, (3) 液 2 毫升混匀, 加水至 200 毫升, 装于瓶中。置冰箱中两周内有效。此试剂配好后, 放 2—3 小时后即可使用。

(7) 透明液: 甲醇: 冰醋酸: 甘油按 85: 14: 1 比例混匀(亦可不加甘油; 临用前配制较好。)

(8) 醋酸纤维膜: 可裁成 6×2 厘米长条。

(9) 灯管: 紫外光灯管一支, 30 瓦, 2537 Å。安装于细菌培养接种罩内, 可供消毒, 臭氧化两用。

操作步骤

(1) 电泳: 将已在电泳缓冲液中浸湿的醋酸纤维膜条取出, 用滤纸吸去多余液体。于毛面点血浆 (EDTA—Na₂ 抗凝) 或血清 3—5 微升。然后, 毛面向下, 点样端靠阴极,

悬架于电泳槽上。电压 150 伏,通电 35—40 分钟。

(2) 臭氧化: 将脂蛋白电泳分离后的醋酸纤维薄膜,浸入 5% 三氯乙酸溶液中 10 分钟,再浸入 70% 甲醇 1 分钟,烘干。然后将毛面向上,置紫外光灯接种罩内,相距约 8 寸左右,开灯,直接照射 10—15 分钟。

(3) 染色: 臭氧化后的膜再浸入 0.001N 盐酸中,待浸湿,再浸入亚硫酸品红染色液中 10 分钟,待各区带呈红色,再浸入 0.1N 盐酸漂洗液中漂洗数次。

(4) 结果判断: 自阴极端起,原点为乳糜微粒,依次为 β -、前 β -和 α -脂蛋白。

(5) 透明化: 如需保存或用光密度计测定,可使呈透明状。步骤为: 从 0.1N 盐酸中取出已染色的膜,浸入 1% 醋酸溶液 5 分钟;浸入甲醇 30 秒钟;浸入透明液 1—2 分钟,将膜取出,平贴于洁净玻板上,放 37—60℃ 待干,放凉,揭下夹于厚书内,即得透明的脂蛋白图谱。

讨论

(1) 第一种方法以过氧化钡加硫酸法是常用的方法。第二种方法以紫外光灯照射代替过氧化钡进行臭氧化,并在操作过程中增加 5% 三氯乙酸溶液固定和 70% 甲醇浸泡,这二步骤可以提高脂蛋白各区带(特别是 β -脂蛋白和前 β -脂蛋白)的分辨率。

(2) 醋酸纤维薄膜脂蛋白电泳,结合血清脂质的外观和化学测定分析,可简易确定高脂蛋白血症的类型。

高脂血症类型	血清外观	胆固醇	甘油三酯	醋酸纤维薄膜电泳图谱
I	乳糜微粒	正常或偏高	显著增高	乳糜微粒带明显,其它正常
II _a	清	显著增高	正常	β -带明显增高,前 β -正常
II _b	微混	稍增高	稍增高	β -带和前 β -带明显增高
III	清或云雾状混浊	显著增高	稍增高	出现宽 β -带,乳糜微粒带模糊
IV	清或微混	正常或稍高	显著增高	前 β -带显著增高, β -带正常,乳糜微粒带不明显
V	混浊或乳糜微粒	稍增高	显著增高	乳糜微粒带明显,前 β -带增高

(二) 聚丙烯酰胺脂蛋白电泳^[12]

原理

聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺和双丙烯酰胺在催化剂作用下进行聚合而成。以此凝胶为载体可作血清脂蛋白电泳分析。由于这种凝胶电泳兼有分子筛和电泳的联合作用,且凝胶透明度强,因此大大提高了它的分辨能力。通过凝胶电泳,可将血清脂蛋白各组份清楚地分离。

试剂

1. 0.5M Tris-0.04M EDTA 缓冲液 称取 Tris 6.057 克, EDTA 1.17 克,加少量蒸馏水溶解后,稀释定容至 100 毫升。pH 值为 8.8。(置冰箱保存。)

2. 10% 过硫酸铵溶液 称取过硫酸铵 0.5 克,溶于 5 毫升蒸馏水中。(最好临用前配,至多放置一周)

3. 25% 蔗糖溶液 称取 2.5 克蔗糖溶于 10 毫升蒸馏水中。

4. 电泳缓冲液的配制 0.4M 硼酸、硼砂缓冲液: 称取硼砂 30.512 克, 硼酸 4.948 克, 加蒸馏水溶解并稀释至 1000 毫升。每次用时取 90 毫升加蒸馏水至 1440 毫升 (0.025M, pH9.0)。

用 Tris、甘氨酸缓冲液, 或其它缓冲液也可以。

5. 20% 单体母液的配制 称取丙烯酰胺 19.6 克, 双丙烯酰胺 0.4 克, 加蒸馏水溶解稀释并定容至 100 毫升(置冰箱保存)。

6. 乙酰苏丹黑溶液 称取 2 克苏丹黑 B 加 60 毫升吡啶, 40 毫升醋酐, 混合放置过夜后, 再加 3 升蒸馏水, 乙酰苏丹黑即析出。抽滤后再溶于丙酮中, 将丙酮蒸发, 剩余物即为乙酰苏丹黑。将乙酰苏丹黑溶于无水乙醇中制成饱和溶液。

7. 50% 四甲基乙烯二胺 (TEMED) 溶液 将四甲基乙烯二胺原液用蒸馏水稀释一倍。

操作步骤

1. 凝胶制备 脂蛋白电泳一般采用分离胶和样品胶组成的凝胶管, 下层为分离胶约含 4% 丙烯酰胺, 上层为样品胶约含 2.5% 丙烯酰胺。其制备如下:

(1) 分离胶制备:

20% 单体母液 2.4 毫升,

Tris-EDTA 缓冲液 1.2 毫升,

蒸馏水 7.0 毫升,

50% 四甲基乙烯二胺溶液 0.05 毫升。

置三角烧瓶中, 混匀, 再加入 10% 过硫酸铵溶液 0.15 毫升, 混匀。迅速用吸管分装于玻璃管中, (两通玻璃管, 一头用橡皮塞封固。) 每管约 0.8—1.0 毫升左右。然后覆盖一层蒸馏水, 放置室温 30 分钟即可聚合完全。

(2) 样品胶的制备: 除取 20% 单体母液为 1.8 毫升外, 加入的其他试剂量及操作与分离胶制备法相同。将上述分离胶上层蒸馏水吸去, 每管加入样品胶 0.2 毫升左右, 再覆盖一层蒸馏水, 放置 30 分钟聚合后即可使用。

2. 加样 取血清 0.18 毫升, 加乙酰苏丹黑 0.02 毫升, 置 37℃ 温箱 15 分钟, 再加入 25% 蔗糖溶液 0.2 毫升, 然后取 30 微升此混合液置于上述胶管的液面上, 加电泳缓冲液使之充满至胶管管口。将胶管下端橡皮塞去掉。

3. 电泳 将上述已加入样品的胶管, 插入带孔的电泳槽中, 紧塞, 务必不使漏水。在上下两槽中分别注入电泳缓冲液。然后通电, 每支胶管需电流为 3—5 毫安。一般通电为 20—30 分钟。

4. 结果判断 用肉眼直接观察各区带颜色深浅, 宽窄。(脂蛋白染成黑蓝色。) 脂蛋白主要组份相对位置从阴极端到阳极端为: 染料、乳糜微粒、前 β -脂蛋白、 β -脂蛋白和 α -脂蛋白。

讨论

(1) 在制备凝胶时, 加入 20% 单体母液的量可根据丙烯酰胺和双丙烯酰胺的质量略有增减。加入催化剂后, 最好在 5 分钟内分装于玻璃管。

(2) 样品要新鲜,不能超过 24 小时;电泳时温度以室温 18—22℃ 为佳,10℃ 时各区带可以分开,但比较模糊,4℃ 以下各脂蛋白不能分开,30℃ 结果欠佳。样品量以 30 微升为最好。电泳时凝胶不要有气泡。

(3) 电泳时间以 20—30 分钟为宜,少于 15 分钟各区带分不开,超过 40 分钟各区带又太分散而影响结果观察。

(4) 本电泳分离方法中前 β -脂蛋白的位置或醋酸纤维薄膜电泳法中不同。主要原因是聚丙烯酰胺凝胶具有分子筛的作用。

参 考 资 料

- [1] Wijs, J. J., *J. Soc. Chem. Ind.*, **17**, 698. (1898).
- [2] 张志贤,油脂蜡检验, (1959), 科技卫生出版社。
- [3] 中华人民共和国商业部编印: 国家粮油品质检验标准及操作规程汇编(内部规定), (1974)。
- [4] Berenson, G. S. etc., *Clinical Chemistry*, **18**, 1463, (1972).
- [5] Abell, L. L. etc., *J. Biol. Chem.* **195**, 357, (1952).
- [6] Zlalkis, A. etc., *J. Lab. Clin. Med.*, **41**, 486 (1953).
- [7] 游凯、刘泽民、陶寿琪,中华医学杂志, **51**, 419, (1965)。
- [8] 成都军区总医院检验科,临床检验资料汇编,甘肃省卫生局编, 26 页, (1977), 甘肃人民出版社。
- [9] 上海第一医学院中山医院,上海市心血管病研究所中心实验室,中华医学杂志, **55**, 55, (1975)。
- [10] Gradwohl's Clinical Laboratory Method and Diagnosis, vol. I, 243, (1970) Saint Louis.
- [11] 江西中医学院附属医院检验科,生物化学与生物物理学报, **9**, 389, (1977)。
- [12] 全军血脂测定法学习班,临床检验资料汇编,甘肃省卫生局编, 14 页, (1977), 甘肃人民出版社。

第三章 蛋白质类

蔡武城 赵志安

凡有生命之处都离不开蛋白质的存在。蛋白质是生物体的主要组成成份,是各种生命现象与生理活动的最重要物质基础之一。

氨基酸是组成蛋白质的基本单位。蛋白质用酸、碱或酶水解的最终产物是氨基酸。

氨基酸的结构通式为
$$\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{R}-\text{C}-\text{COOH} \\ | \\ \text{NH}_2 \end{array}$$
。天然蛋白质中的氨基酸有廿种,都属于L型的 α -

氨基酸(除脯氨酸和羟脯氨酸是 α -亚氨基酸),各种氨基酸在结构上的差异都表现在R基团上。

蛋白质是复杂的高分子化合物,由氨基酸以肽键相互联接而成,分子量从几万到几百万,溶于水成亲水性胶体溶液。由于各种蛋白质分子内氨基酸的数目和排列顺序不同,因此决定了蛋白质的种类繁多,结构复杂,功能各异。如按其分子组成,蛋白质又可分为两大类:(1)完全由氨基酸构成的简单蛋白质,如清蛋白和球蛋白;(2)由简单蛋白质与非蛋白质物质构成的结合蛋白质,如核蛋白、糖蛋白、脂蛋白、磷蛋白和色蛋白等。

本章介绍了氨基酸和蛋白质的定性和定量的化学测定方法。对于氨基酸和蛋白质的定量测定介绍了多种方法,以便读者根据样品种类与性质,灵敏度要求以及设备条件进行适当的选择。

第一节 氨基酸和蛋白质的定性测定

氨基酸和蛋白质的定性测定是利用适当的试剂使被鉴定物质显出一定颜色,以辨别它们在电泳或层析谱上不能直接看到的分布位置或种类。本节所述显色方法以滤纸显色为代表,辅以凝胶的染色法。凝胶薄层经滤纸复印*后类同纸上染色步骤。

一、氨基酸的定性测定

(一) 氨基酸的一般显色反应

本节介绍三种显色反应——茚三酮法、吲哚醌法及邻苯二甲醛法。前二种是经典的

* 滤纸复印法——薄层凝胶层析是一种湿板层析,层析后用薄层一样大小的厚滤纸(新华三号或 Whatman 3MM)覆盖于层析后的薄板上(注意覆盖滤纸时绝对不能影响薄层表面,亦不能使滤纸与表面之间产生气泡),5分钟左右,被分离的物质即可复印于滤纸上,吹干后,用纸上染色法相同步骤染色。复印后滤纸上带有少量凝胶,不会妨碍染色,亦不影响层析效果。

常用显色法,后一种是近年来发展起来的荧光显色法,具有灵敏度高特点。

1. 茚三酮法^[1,2] 茚三酮显色原理见第 52 页。

显色方法有下列数种:

(1) 常用法: 将点有样品的层析或电泳完毕的滤纸充分除尽溶剂,用 0.5% 茚三酮无水丙酮溶液喷雾,充分吹干,置 65℃ 烘箱中约卅分钟(温度不宜过高,避免空气中氨,以免背景泛红色),氨基酸斑点呈紫红色。

为了使各种氨基酸呈现不同颜色,可用下列方法:

(2) 以 0.4 克茚三酮,10 克酚和 90 克正丁醇之混合液显色。

(3) 以 0.1% 茚三酮无水丙酮溶液显色完毕后,再以盐酸蒸汽熏一分钟。

(4) 以 1 克茚三酮,600 毫升无水乙醇,200 毫升冰醋酸及 80 毫升 2,4,6-三甲基吡啶混合液 80℃ 染色 5—10 分钟。

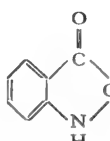
为了使显色稳定,可用下列方法:

(5) 配制含醋酸镉 2 克加蒸馏水 200 毫升及冰醋酸 40 毫升的贮存液。将上述贮存液加 200 毫升丙酮及 2 克茚三酮,即为显色液。点有样品的滤纸上浸有此显色液后,放置于盛有一小杯浓硫酸的密闭玻璃容器中,25℃,18 小时,或较高温度下适当缩短时间。背景色浅,氨基酸斑点也比较稳定。

(6) 以含 0.2% CoCl_2 (或 CuSO_4) 的 0.4% 茚三酮异丙醇溶液显色时,氨基酸斑点呈红色,也可在茚三酮显色后喷以含钴、镉或铜等无机离子的异丙醇溶液,斑点自蓝紫色变成红色。

2. 吡啶醌法^[1,2]

原理

吡啶醌结构如下: 。各种氨基酸与吡啶醌试剂能显示不同颜色,因此可

借此辨认氨基酸。氨对吡啶醌显色没有妨碍,但其灵敏度较茚三酮法稍差,显色不稳定,颜色只有在绝对干燥的环境中才能保存。

试剂

(1) 显色剂: 1 克吡啶醌溶于 100 毫升乙醇及 10 毫升冰醋酸中(若冰醋酸用量减少则灵敏度稍差)。

(2) 底色褪色剂: 在 100 毫升 20% 碳酸钠溶液中加入 60 克硅酸钠 ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 在水浴 (60—70℃) 上加热搅拌直至完全溶解,待溶液比较清澈为止。在溶解过程中,有时硅酸钠会结成凝胶,此时只需继续耐心搅拌即可溶解。配制时若硅酸钠用量多则褪色较快,但背景容易变黄,硅酸钠用得少 (40 克),虽褪色较慢,但背景较为洁白。

显色步骤

层析或电泳后滤纸烘干后,仔细喷上或涂上显色剂,用电吹风迅速吹干,待醋酸气味

不太刺鼻时移置 100℃ 烘箱烘 5—15 分钟,直至显色为止(温度不要太高,以免引起减色)注意观察所显出的颜色,然后均匀地涂上底色褪色剂,纸的背景即由黄色变为绛红而后逐渐变浅,待黄色背景几乎褪尽时,迅速用电吹风吹干,并随时观察颜色的变化。例如苏氨酸在褪色前为浅红带褐色,褪色后则呈橙黄色或黄色;脯氨酸在褪色前为蓝色,吹干时很快褪成无色。室温较低时,底色褪色很慢,此时可将褪色剂加温到 30—40℃,再行褪色;温度过高也不宜,因氨基酸斑点的褪色速度也同时加快,应避免之。

其他显色步骤为: 显色剂为 1 克吡啶酮, 1.3 克醋酸锌溶解于 70—80 毫升热异丙醇中,冷却后加 1 毫升吡啶。或者 1 克吡啶酮, 1.5 克醋酸锌溶解于 95 毫升热异丙醇中,加 3 毫升水,冷却后加 1 毫升冰醋酸。点有样品的滤纸仔细喷以显色剂后, 80—85℃ 放置 10 分钟,背景可用水迅速浸洗去而不使氨基酸斑点退去。

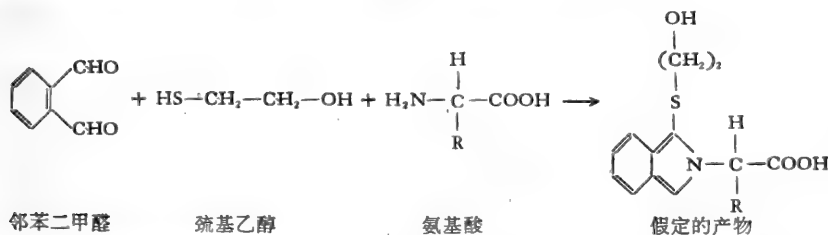
由于吡啶酮试剂配制方法不同,对同一种氨基酸所显颜色往往也有差异。

3. 邻苯二甲醛法^[3,4]

邻苯二甲醛法是目前纸上层析、硅胶薄层层析荧光显色氨基酸最灵敏的方法之一,也可用于氨基酸溶液定量,并推广应用于乙内酰苯硫脲氨基酸、多肽和蛋白质的检出和定量。根据文献报道,氨基酸纸上层析灵敏度达 500 微微克分子,在硅胶薄层层析上为 50—200 微微克分子。这里介绍在纸上层析呈现氨基酸方法。(荧光胺是另一种常用的荧光试剂,由于荧光胺来源比较困难,这里未作介绍)

原理

邻苯二甲醛在 2-巯基乙醇存在下,于碱性溶液中与氨基酸作用产生荧光化合物,最适的激发光和发射光波长分别为 340 和 455nm。可能的产物为:



各种氨基酸显现的荧光强度不同,其相对荧光强度由大到小大致顺序如下: 天门冬氨酸,异亮氨酸,甲硫氨酸,精氨酸,组氨酸,亮氨酸,丝氨酸,缬氨酸,谷氨酸,苏氨酸,甘氨酸,色氨酸,丙氨酸,苯丙氨酸,赖氨酸,酪氨酸, NH_3 , 脯氨酸和半胱氨酸。

试剂

邻苯二甲醛显色液: 取 0.1 克邻苯二甲醛(化学纯), 0.1 毫克巯基乙醇, 1 毫升三乙胺,加丙酮:石油醚(60—90℃)=1:1 的混合溶剂至 100 毫升。放置半小时后使用。

显色步骤

将含有氨基酸样品的滤纸浸于邻苯二甲醛显色液 1 分钟,冷风吹干,在温度 18℃ 以下,湿度 50—90% 之间显色半小时,于紫外灯下观察荧光点。

讨论

在滤纸上显现氨基酸时,邻苯二甲醛浓度以 0.1% 为宜。显色时必须有一定的湿度,以便氨基酸溶解,提高分子碰撞机率,并使极性基团解离,促进反应趋于完全。湿度太低,显不出荧光。温度对显现的荧光延时有显著影响,温度高荧光延时短,温度低荧光延时长。

(二) 个别氨基酸的显色反应

利用个别氨基酸与某些试剂具有特殊的显色反应定性氨基酸。可应用于纸层析和纸电泳显色,也可单独应用。方法很多,仅常用的方法介绍如下:

1. 精氨酸的显色——坂口 (Sakaguchi) 反应^[2,5]

(1) 第一种方法:

试剂

试剂甲: 5 克尿素溶解于 100 毫升 0.01% α -萘酚乙醇中。使用前,每 100 毫升加约 5 克氢氧化钾。

试剂乙: 0.7 毫升溴水溶解于 100 毫升 5% 氢氧化钠中。

显色步骤

在点有样品的滤纸上喷试剂甲后,在空气中吹几分钟,再喷以试剂乙。精氨酸或含精氨酸的多肽显红色。灵敏度为 0.2 微克精氨酸。茚三酮显色后,仍可应用此法,精氨酸的颜色从紫红色变成红色。此试剂对含精氨酸的蛋白质也适用。

(2) 第二种方法:

试剂

试剂甲: 0.1% 8-羟基喹啉的丙酮溶液。

试剂乙: 0.02 毫升溴水溶解于 100 毫升 0.5N 氢氧化钠。

显色步骤

将点有样品的滤纸烘干后,喷上试剂甲,吹干后,再喷以试剂乙。精氨酸或其他胍类物质显桔红色。

2. 胱氨酸和半胱氨酸的显色^[2,6]

试剂

试剂甲: 1.5 克亚硝基铁氰化钠 ($\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶于 5 毫升 2N 硫酸,加 95 毫升甲醇。此时会有沉淀产生,可保存一个月以上。使用时在每 100 毫升上述溶液中加入 10 毫升 28% 氨水,过滤除去沉淀,清液仅能保持一天左右。

试剂乙: 2 克氰化钠溶于 5 毫升水中,然后加 95 毫升甲醇。此时有沉淀产生,使用时只需摇匀即可。

显色步骤

半胱氨酸的显色：在滤纸上喷以试剂甲的清液，5分钟后半胱氨酸显红色。

胱氨酸的显色：先将滤纸浸入试剂乙，迅速取出，稍待片刻再喷以试剂甲的清液，5分钟后胱氨酸显红色。亦可以把试剂甲与试剂乙配制的浓度增加一倍，在显色前混和，再行喷上滤纸。

本法只对半胱氨酸中的巯基有效，它的衍生物如 S-苄基半胱氨酸没有显色反应。

3. 甘氨酸的显色^[2,7]

试剂

0.1 克邻苯二甲醛溶于 100 毫升 77% 乙醇中。

显色步骤

点有样品的滤纸喷以试剂，甘氨酸显墨绿色，在汞灯 (365nm) 下显巧克力棕色。吡啶显色后，再用此试剂仍有效。以甘氨酸为 N 端的小肽也能显色，但其 N 端被保护后，以及其他氨基酸均不显色。

4. 脯氨酸的显色^[8]

试剂

1 克吡啶酮和 1.5 克醋酸锌，1 毫升醋酸，5 毫升蒸馏水混和，再加入 95 毫升异丙醇。新鲜配制。

显色步骤

层析滤纸除尽溶剂，喷以试剂，80—85℃ 烘箱内放置 30 分钟，脯氨酸显蓝色，再以 30℃ 温水漂洗除去多余的试剂后，背景为白色或浅黄色。

也可剪下脯氨酸斑点，于试管中加入 5 毫升水饱和酚，在黑暗中洗脱 15 分钟，间歇振荡，于 610nm 测定其光密度。从已知标准曲线即可求得样品内脯氨酸含量，测定范围 5—20 微克脯氨酸。

5. 丝氨酸和羟赖氨酸的显色

试剂

试剂甲：0.035M 过碘酸钠 (748 毫克 NaIO_4 溶于数毫升甲醇，加 2 滴 6N 盐酸，再用甲醇稀释至 100 毫升)。

试剂乙：15 克醋酸铵加 0.3 毫升冰醋酸，加 1 毫升乙酰丙酮，用甲醇稀释到 100 毫升。

显色步骤

点有样品的滤纸吹干，先喷以试剂甲，近干后再喷试剂乙，室温放置 2 小时，紫外光灯下照半小时，丝氨酸和羟赖氨酸呈黄色斑点，在紫外线下都有荧光。

6. 羟脯氨酸的显色^[9]

试剂

试剂甲：1克吡啶酮溶于100毫升乙醇及10毫升冰醋酸。

试剂乙：1克对二甲胺苯甲醛溶于100毫升的丙酮浓盐酸(9:1)混合液中。(此试剂不稳定,隔数日后溶液色增深发黑,灵敏度降低,故用时新鲜少量配制。)

显色步骤

将待鉴定的溶液点于小方块层析纸上,干后先点上试剂甲,热风吹干。这时纯羟脯氨酸呈墨绿色,纯脯氨酸呈深蓝色(极灵敏),对其他氨基酸呈程度不同的紫红色(不太灵敏);然后再点上试剂乙吹干,如溶液中含有羟脯氨酸即转变为玫瑰红色,而其他氨基酸与吡啶酮所生成的颜色则褪去。

7. 色氨酸的显色

(1) 第一种方法^[10]:

试剂

1克对二甲氨基苯甲醛加90毫升丙酮,10毫升浓盐酸。新鲜配制。

显色步骤

点有样品的滤纸干燥后,喷以试剂,室温下几分钟后,色氨酸显蓝或紫红色。茚三酮显色后,仍可使用本法。

(2) 第二种方法^[11]:

试剂

10毫升35%甲醛加10毫升25%盐酸,20毫升无水乙醇。

显色步骤

点有样品的滤纸喷以试剂后,100℃烘5分钟,色氨酸在长波长紫外光下呈现荧光(黄-橙-带绿色)。

8. 酪氨酸的显色^[12]

试剂

试剂甲：0.1% α -亚硝基- β -萘酚的95%乙醇溶液。

试剂乙：10%硝酸水溶液。

显色步骤

点有样品的滤纸上喷以试剂甲后,吹干,再喷以试剂乙,然后在100℃烘3分钟,酪氨酸或含酪氨酸的多肽在浅灰绿色的背景上显红色,半小时后转变为桔红色,其后渐退去。灵敏度1—2微克酪氨酸。茚三酮显色后,再用此试剂处理,仍能显色,茚三酮所显出的紫

红色斑点变成红色。

9. 酪氨酸和组氨酸的显色——Pauly 反应^[13]

试剂

试剂甲：4.5 克对氨基苯磺酸与 45 毫升 12N 盐酸共热溶解，以蒸馏水稀释至 500 毫升。用时取出 30 毫升，在 0℃ 与等体积之 5% 亚硝酸钠水溶液相混合。（室温放置太长要失灵）

试剂乙：10% 碳酸钠水溶液。

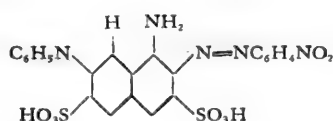
显色步骤

点有样品的滤纸上喷试剂甲，片刻后再喷以试剂乙。组氨酸及含组氨酸的多肽显桔红色；酪氨酸及含酪氨酸的多肽显浅红色。

二、蛋白质的定性测定

（一）蛋白质的一般显色反应^[2,14]

1. 氨基黑法



氨基黑 10B 是酸性染料，其磺基与蛋白质反应构成复合盐，是最常用的蛋白质染料。

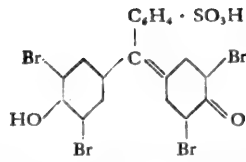
（1）经电泳或层析后的滤纸，浸入氨基黑 10B 醋酸甲醇溶液（13 克氨基黑 10B 溶于 100 毫升冰醋酸和 900 毫升甲醇中，充分摇匀，放置过夜，过滤后可反复使用几次），染色 10 分钟，染色后，用 10% 醋酸甲醇溶液洗涤约 5—7 次，待背景变成浅蓝色即止，干燥之。若欲进行洗脱，用 0.1N 氢氧化钠浸泡 30 分钟，于 595nm 比色测定。

（2）聚丙烯酰胺凝胶电泳后染色：用甲醇固定后，在含 1% 氨基黑 10B 0.1N 氢氧化钠溶液染色 5 分钟（室温），用 5% 乙醇脱背景底色。或用 7% 醋酸固定后，于 96℃ 水浴中用 7% 醋酸（含 0.5—1% 氨基黑 10B）染色 10 分钟，7% 醋酸脱背景底色。用氨基黑染 SDS-蛋白质时效果不好。如果凝胶中含有两性离子载体，先用 10% 三氯醋酸浸泡，每隔 2 小时换液一次，约 10 次，再行染色。

（3）凝胶薄层的直接染色：将凝胶薄层放在一定湿度的烘箱内逐步干燥（50℃），没有调温调湿箱时用一张滤纸放于烘箱内，以保持一定的湿度。将干燥的薄层板于漂洗液（750 毫升甲醇，200 毫升水，50 毫升冰醋酸）中预处理十分钟，然后在染色液（750 毫升甲醇，200 毫升水，50 毫升冰醋酸，在此溶液中加入氨基黑 10B 饱和）中染色 5 小时，再在漂洗液内洗涤。

本法优点是灵敏度尚高，缺点是花费时间长，不同蛋白质染色强度不同。

2. 溴酚蓝法

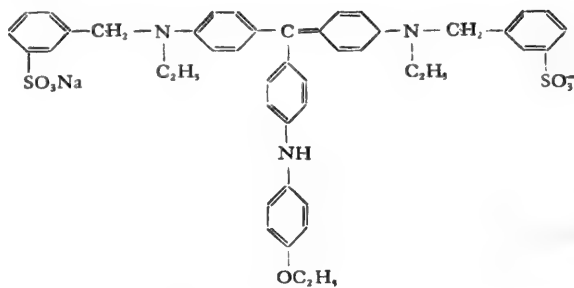


经电泳或层析后滤纸或凝胶于 0.1% 溴酚蓝固定染色液(溴酚蓝 1 克, 氯化汞 100 克溶于 50% 乙醇水溶液中, 用 50% 乙醇稀释至 1000 毫升)中浸泡 15—20 分钟, 在 30% 乙醇:5% 醋酸水溶液中漂洗过夜。如欲洗脱, 可用 0.1N NaOH。

此法缺点是灵敏度低, 某些分子量低的蛋白质可能染不出。

3. 考马斯亮蓝法

考马斯亮蓝 R250



该染料和蛋白质的结合是通过范德瓦耳键。考马斯亮蓝含有较多疏水基团, 和蛋白质的疏水微区有较大的亲和力, 而和凝胶基质的亲和力不如氨基黑, 所以用考马斯亮蓝染色的漂洗要容易得多。

(1) 经电泳后滤纸或醋酸纤维膜在 20% 磺基水杨酸溶液中浸 1 分钟, 取出后放入 0.25% 考马斯亮蓝 R250 染色液(配制用的蒸馏水内不含有重金属离子) 5 分钟, 在蒸馏水或 7% 醋酸中洗四次, 每次 5 分钟, 于 90℃ 放置 15 分钟。

(2) 聚丙烯酰胺凝胶也可同上处理。在酸性醇溶液中, 考马斯亮蓝-兼性离子载体络合物溶解度显著增大, 因此能免去清除兼性离子载体的步骤。可运用下列方法之一:

凝胶用 10% 三氯醋酸固定, 在 10% 三氯醋酸-1% 考马斯亮蓝 R250 19:1(v/v) 中室温染色半小时, 用 10% 三氯醋酸脱底色。

凝胶浸入预热至 60℃ 的 0.1% 考马斯亮蓝固定染色液(150 克三氯醋酸, 45 克磺基水杨酸溶于 375 毫升甲醇和 930 毫升蒸馏水的混合液。每 1 克考马斯亮蓝 R250 溶于此混合液 1000 毫升中)中约 30 分钟, 用酸性乙醇漂洗液(乙醇:水:冰醋酸 = 25:25:8)洗尽背景颜色。染色后胶柱保存于酸性乙醇漂洗液中。本法灵敏度: 卵清蛋白 0.03 微克, 血清清蛋白 0.02 微克, 血红蛋白 0.01 微克。

凝胶浸入考马斯亮蓝固定染色液(考马斯亮蓝 R250 2 克, 溶于 100 毫升蒸馏水中, 加 2N 硫酸 100 毫升, 过滤除去沉淀, 向清液中滴加 10N KOH 至颜色从绿变蓝为止。量体积, 每 100 毫升加入三氯醋酸 12 克)中 1 小时, 然后用蒸馏水洗净背景颜色或 0.2% H₂SO₄ 浸片刻脱背景颜色。染色后的胶柱保存于蒸馏水中。本法机制未明, 起染色作用的可能不是考马斯亮蓝本身, 灵敏度不如上法。

考马斯亮蓝法灵敏度比氨基黑高五倍, 尤其适用于 SDS 电泳的微量蛋白质的染色。

在 549nm 有最大吸收值,蛋白质在 1—10 微克呈线性关系。

4. 酸性品红法

经电泳后滤纸置于 0.2% 酸性品红溶液(2 克酸性品红溶液溶解于 500 毫升甲醇, 400 毫升蒸馏水, 100 毫升冰醋酸中)加热染色 15 分钟;取出后浸入醋酸甲醇溶液(500 毫升甲醇,加 400 毫升蒸馏水和 100 毫升冰醋酸)15 分钟;然后浸入 10% 醋酸溶液,每次 20 分钟,至背景无色为止。若欲进行比色,可用 0.1N 氢氧化钠溶液浸出 2 小时,于 570nm 比色。

5. 氨基萘酚磺酸法

聚丙烯酰胺凝胶电泳后,把凝胶柱暴露于空气中几分钟,或在 2N 盐酸中浸一下使表层蛋白变性,再在 0.003% 氨基萘酚磺酸的 0.1M 磷酸盐缓冲液(pH6.8)中染 3 分钟,在紫外光下可显黄绿色荧光。这样的染色可保留凝胶内部的酶和抗体的活性。如不需保留活性时,可先在 3N 盐酸中浸 2 分钟以上使蛋白质充分变性,再染色。

(二) 复合蛋白质的显色反应

1. 糖蛋白的显色

(1) 过碘酸-Schiff 氏试剂显色法:

试剂

过碘酸液: 1.2 克过碘酸溶解于 30 毫升蒸馏水中,加 15 毫升 0.2M 醋酸钠溶液及 100 毫升乙醇。临用前配制,或保持于棕色瓶中,可用数日。

还原液: 5 克碘化钾,5 克硫代硫酸钠溶于 100 毫升蒸馏水中,加 150 毫升 95% 乙醇及 2.5 毫升 2N HCl。现配现用。

亚硫酸品红液: 2 克碱性品红溶解于 400 毫升沸水中,冷却至 50℃ 过滤。在滤液中加 10 毫升 2N 盐酸和 4 克偏亚硫酸钾($K_2S_2O_5$),将瓶塞紧置于冰箱过夜,加 1 克活性炭,过滤,再逐渐加 2N 盐酸,直至此溶液在玻片上干后不变红色为止,保存于棕色瓶中,冰箱贮存,当溶液变红,即不可用。

亚硫酸盐冲洗液: 在 100 毫升水中含有 1 毫升浓硫酸,0.4 克偏亚硫酸钾。

显色步骤

将含有样品的滤纸浸于 70% 乙醇中,片刻后吹干,在高碘酸液中浸 5 分钟,以 70% 乙醇洗一次,在还原液中浸 5—8 分钟,以 70% 乙醇洗一次,在亚硫酸品红液中浸 24—25 分钟,以亚硫酸盐冲洗液中洗三次,再乙醇脱水后,放在玻璃板上吹干。显色结果: 在深灰色的底板上呈现紫红色。

(2) 甲苯胺蓝(Toluidine blue)显色法:

试剂

试剂甲: 1.2 克过碘酸溶解于 30 毫升蒸馏水中,加 15 毫升 0.5M 醋酸钠和 100 毫升 96% 乙醇。现配现用。

试剂乙: 100 毫升甲醇加 20 毫升冰醋酸及 80 毫升蒸馏水。

试剂丙：溴水。

试剂丁：1% 甲苯胺蓝水溶液。

试剂戊：4% 钼酸铵溶液。

显色步骤

将点有样品的滤纸浸入试剂甲 15 分钟，试剂丙 15 分钟，在自来水中漂洗后，于试剂丁中浸 30 分钟，再在自来水中漂洗至没有蓝色染料渗出(约 30—40 分钟)，于试剂戊中浸 3 分钟，放到试剂乙中浸 15 分钟，浸入丙酮中 2 分钟，空气中干燥。显色结果：糖蛋白部分染成蓝色，背景带有红紫色。

(3) 阿尔新蓝 (Alcian blue) 显色法：

聚丙烯酰胺凝胶在 12.5% 三氯醋酸中固定 30 分钟后，再用蒸馏水轻轻漂洗。放入 1% 过碘酸液(在 3% 醋酸中)中氧化 50 分钟。用蒸馏水反复洗涤去除多余的过碘酸盐。再放入 0.5% 偏重亚硫酸钾中还原剩余的过碘酸盐 30 分钟，再用蒸馏水洗涤。浸在 0.5% 阿尔新蓝(在 3% 醋酸中)染 4 小时。

2. 脂蛋白的显色

(1) 苏丹黑 (Sudan black) 显色法：

将 0.1 克苏丹黑 B 溶解于煮沸的 100 毫升 60% 的乙醇溶液中，制备成饱和溶液，冷却后过滤两次，备用。

显色时将点有样品的滤纸浸于上述溶液中，3 小时后取出，以 50% 乙醇溶液洗涤两次，每次 15 分钟，空气中干燥。

聚丙烯酰胺凝胶电泳中预染法——加苏丹黑 B 到无水乙醇中成饱和液，并摇荡使乙酰化。用前过滤。按样品液的 1/10 量加入样品液中染色 1 小时或 4℃ 过夜。染色后的样品再进行电泳。

(2) 油红-O(Oil red O) 显色法：

0.04 克油红溶解于 100 毫升 60% 乙醇中，30℃ 放置过夜(16 小时)使充分饱和后，在 30℃ 下滤去多余的染料，澄清的溶液即可作染色用。

染色时将滤纸浸入染料液中，30℃，18 小时，以水冲洗，使背景变浅，在空气中干燥。脂蛋白部分红色，背景桃红色。本法在 30℃ 以下显色会引起染料沉淀。

第二节 氨基酸的定量测定

本节主要阐述氨基酸的定量方法，至于氨基酸分离的柱层析法可参阅本丛书有关分册及有关资料^[2]。氨基酸自动分析仪在国外已普遍使用，国内也在逐渐发展中。

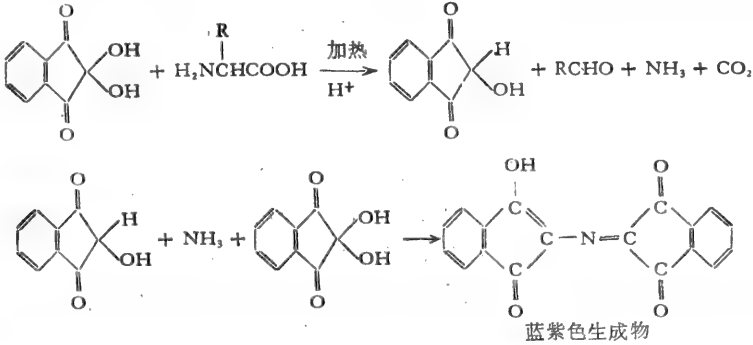
一、氨基酸的一般定量测定

(一) 茚三酮法^[1]

原理

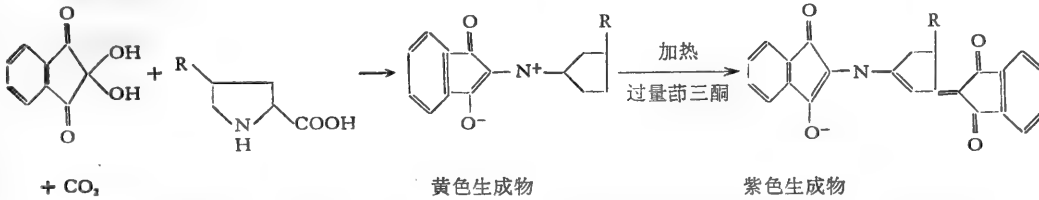
茚三酮法是氨基酸定量测定应用最广泛的方法之一。当茚三酮在酸性条件下和氨基

酸反应时,氨基酸被氧化分解生成醛,放出氨和二氧化碳,水合茛三酮则成还原型水合茛三酮,然后还原型茛三酮与氨、另一分子茛三酮进一步缩合生成蓝紫色物,最大吸收值的波长为 570nm。



此反应为一切 α -氨基酸所共有,反应灵敏,根据反应所生成的蓝紫色深浅,可以测定氨基酸含量。本法可允许的测定范围是 0.5—50 微克氨基酸。

脯氨酸和羟脯氨酸与茛三酮反应则得到的是黄色生成物, 最大吸收值的波长在 440nm, 在有过量水合茛三酮及加热的条件下,生成物为紫色,最大吸收值在 550nm。



在反应体系中加入氰化钾、乙二醇甲醚可以提高反应灵敏度,并使产生的颜色稳定。

试剂

1. 氰化钾-乙二醇甲醚-茛三酮溶液 1.25 克茛三酮溶于 25 毫升乙二醇甲醚使成 5%(w/v) 溶液。将 2.5 毫升的 0.01M 氰化钾溶液用乙二醇甲醚稀释至 125 毫升充分混和。然后把 125 毫升氰化钾-乙二醇甲醚溶液与 25 毫升茛三酮-乙二醇甲醚相混和。置试剂瓶中待用。正常情况下应为浅黄色微带青光。配制后必须隔夜才能应用,试剂在一星期内稳定,若超过一星期则反应不灵敏,不宜用作定量。

茛三酮重结晶:茛三酮放置失当,常带微红色,需重结晶后方可应用。5 克茛三酮溶于 15 毫升热水,加入 0.25 克活性炭,轻轻摇动。若溶液太浓不易操作,可酌量加入 5—10 毫升热水,加热 30 分钟后用热水漏斗过滤,滤液放冰箱过夜。次日见黄白色结晶,过滤,再以 1 毫升冷水洗涤结晶,置于干燥器中干燥,棕色瓶内保存。

乙二醇甲醚处理:乙二醇甲醚长期放置,往往含有过氧化物,影响茛三酮溶液显色,使用前宜处理。5 克硫酸亚铁加入 500 克乙二醇甲醚中, 振摇 1—2 小时, 过滤去硫酸亚铁(若滤液混浊无妨), 再进行蒸馏, 收集沸点 121—125°C 馏份,此时应为透明无色。

2. pH5.0, 0.2M 柠檬酸缓冲液 21.008 克柠檬酸(含 1 份结晶水),溶于 200 毫升蒸馏水,再加 200 毫升 1N 氢氧化钠溶液,以蒸馏水稀释至 500 毫升。

3. 60% 乙醇溶液

4. 标准氨基酸溶液 (50 微克/毫升)

操作步骤

(1) 取 1 毫升样品液 (约含 0.5—50 微克的氨基酸) 与 1 毫升 pH5.0, 0.2M 柠檬酸缓冲液充分混和, 然后加入 1 毫升显色剂, 充分混和后在 100℃ 水浴中加热 15 分钟, 自来水冷却放置 5—10 分钟, 待颜色稳定后, 即以 3 毫升 60% 乙醇稀释。充分摇匀, 在 570nm 比色。而脯氨酸、羟脯氨酸则在 440nm 测定。空白以 1 毫升水代替氨基酸溶液, 操作同上。

(2) 标准曲线的制作: 取 8 支试管, 依次加入 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 及 1.0 毫升标准氨基酸溶液 (50 微克/毫升), 分别再加蒸馏水补足至 1 毫升。其余操作同上。以氨基酸的量 (微克) 为横坐标, 光密度值为纵坐标绘制标准曲线。

讨论

(1) 本测定必须在无氨环境中进行, 一切试剂均需放在有草酸的干燥器内, 以免被空气中的氨所沾污。茚三酮与氨基酸所生成的颜色在 1 小时内稳定, 加乙醇稀释后, 应立刻进行比色, 并注意避免阳光。

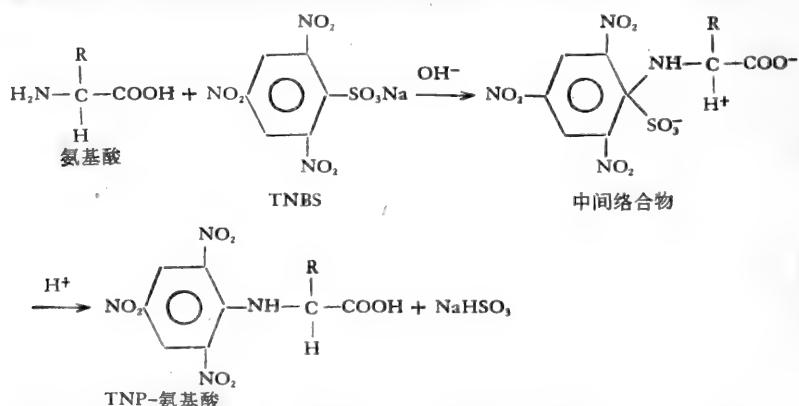
(2) 茚三酮显色剂在 pH5—7 时灵敏, 以 pH5.0 灵敏度最高, 若待测的溶液与此 pH 相距甚远, 离子强度又相当高的时候, 必须用离子强度更高的 pH5.0 的柠檬酸缓冲液。

(3) 本法对于一些小肽也能测定, 在多肽合成中常用来检验有无自由氨基的肽类存在。

(二) 三硝基苯磺酸法^[15]

原理

三硝基苯磺酸 (TNBS) 是定量测定氨基酸的重要试剂之一。TNBS 在偏碱性的条件下与氨基酸反应, 先形成中间络合物 (带有等克分子 SO_3^-), 如下式所示:



中间络合物在光谱上有二个吸收值相近的高峰, 分别位于 355nm 和 420nm 附近。然而溶液一旦酸化, 中间络合物转化成三硝基苯-氨基酸 (TNP-氨基酸), 420nm 处的吸收值显著下降, 而 350nm 附近的吸收峰则移至 340nm 处。

利用 TNBS 与氨基酸反应的这一特性, 可在 420nm 处 (偏碱性溶液中) 或在 340nm (偏酸性溶液中) 对氨基酸进行定量测定。表 3.1 列出各种氨基酸与 TNBS 反应后在不

同条件下测定的光密度值。在 340nm 处,各氨基酸的吸收值大致相近,而在 420nm 处的吸收值因氨基酸种类而异;在加入适量 SO_3^{2-} 时,吸收值升高。

本法允许的测定范围是 0.05—0.4 微克分子氨基酸。

表 3.1 各种氨基酸与 TNBS 反应后在不同条件下测定的光密度值

氨基酸种类	碱性溶液 ⁽¹⁾	碱性溶液加 SO_3^{2-} ⁽²⁾	酸性溶液 ⁽³⁾
甘氨酸	0.30	0.54	0.31
丙氨酸	0.31	0.59	0.30
甲硫氨酸	0.30	0.53	0.30
缬氨酸	0.31	0.57	0.31
亮氨酸	0.30	0.60	0.30
异亮氨酸	0.30	0.56	0.31
苏氨酸	0.30	0.59	0.30
丝氨酸	0.30	0.60	0.30
天冬氨酸	0.19	0.43	0.30
谷氨酸	0.23	0.53	0.30
天冬酰胺	0.30	0.46	0.30
谷氨酰胺	0.31	0.53	0.30
酪氨酸	0.30	0.48	0.30
苯丙氨酸	0.30	0.60	0.30
色氨酸	0.16	0.31	沉淀
组氨酸	0.30	0.50	0.30
赖氨酸	0.60	0.90	沉淀
精氨酸	0.40	0.58	0.30
α -N-苄氧羰基-赖氨酸	0.32	0.45	沉淀
脯氨酸	0	0	
α -N-苄氧羰基-精氨酸	0	0	

(1) 取不同含量氨基酸液 1 毫升,加 4% NaHCO_3 1 毫升,0.1% TNBS 1 毫升,于 40℃ 反应 2 小时,用水补充至 4 毫升,在 420nm 处测定。制作氨基酸浓度— OD_{420} 座标图,从曲线中求得各氨基酸于 1 微克分子时的光密度。

(2) 条件同上,但在与 TNBS 反应时加 0.01 M Na_2SO_3 1 毫升,最后总体积也是 4 毫升,同样在 420nm 处测定。

(3) 条件同(1),但与 TNBS 反应后加 1N HCl 1 毫升酸化,在 340nm 处测定。

试剂

1. 0.1% 三硝基苯磺酸水溶液 (TNBS) 0.1 克三硝基苯磺酸加蒸馏水至 100 毫升,贮于棕色瓶中。

三硝基苯磺酸的制备:先制备三硝基氯苯。取 25 克苦味酸与 50 克五氯化磷混合,于沸水浴中加热搅拌。由于反应时本身发热,固体开始熔化,此时可停止加热。继续搅拌,最后全部呈暗褐色。将反应物倾入大量冰水中,即产生褐色稠状沉淀。过滤并用冷水洗涤沉淀。干燥后将粗制品溶于甲醇,活性炭脱色,加水或 1N HCl 使析出,过滤即得三硝基氯苯,熔点 83℃。取三硝基氯苯 15 克溶于 60 毫升经镁条处理过的无水甲醇,于三颈瓶中分批加入无水 NaHSO_3 粉末 50 克,于 50—60℃ 水浴中回流 1.5 小时。反应后溶液呈棕褐色。产物 TNBS 溶于甲醇,置换下来的 NaCl 及未作用的 NaHSO_3 不溶于甲醇可过滤除去。沉淀用甲醇洗涤数次,洗涤液与滤液合并后用活性炭脱色,然后用 2N HCl 将 pH 调至 1—2,减压浓缩,即得微黄色 TNBS 结晶,在 1N HCl 中重结晶一次。产品部分成钠盐,并不影响使用。若欲除去钠盐可将产品再通过 H 型阳离子柱,由于 TNBS 不吸附,可不用洗脱,钠离子则被交换在柱上。由此所得的 TNBS 为白色含一个结晶水的针状结晶,熔点 186℃。保存于棕色瓶内。

2. 4% 碳酸氢钠溶液 4 克 NaHCO_3 加蒸馏水至 100 毫升。

3. 0.01M 亚硫酸钠溶液 0.252 克 $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 加蒸馏水至 100 毫升。

4. 1N 盐酸溶液。

5. 标准氨基酸溶液 配成 5mM 的水溶液。

操作步骤

1 第一种方法——偏碱性溶液-420nm 系统 待测氨基酸样品溶液(含氨基酸 0.5—4 微克分子) 1 毫升,加 4% NaHCO_3 1 毫升, 0.1% TNBS 1 毫升, 0.01M Na_2SO_3 1 毫升,混和后于 40℃ 反应 2 小时,在 420nm 处测定。空白以蒸馏水代替待测液。

标准曲线制作:

标准氨基酸溶液 (5mM) 0.1—0.8 毫升,补充水至 1 毫升,与上述样品同样操作步骤。

2. 第二种方法——偏酸性溶液-340nm 系统 待测氨基酸样品溶液(含氨基酸 0.5—4 微克分子) 1 毫升,加 4% NaHCO_3 1 毫升, 0.1% TNBS 1 毫升,混和后于 40℃ 反应 2 小时,加 1N HCl 1 毫升,混合后在 340nm 测定。空白以蒸馏水代替待测液。

标准曲线制作: 标准氨基酸溶液 (5mM) 0.1—0.8 毫升,补充水至 1 毫升,与上述样品同样操作步骤。

讨论

(1) 上述两种测定系统,各有利弊,可根据具体情况进行选择。在碱性条件下,各种 TNP-氨基酸衍生物的水溶性均很好,如无紫外分光光度计,可用普通分光光度计代替,测定波长可取 440nm,这时光密度值约相当于 420nm 处的 85%。缺点是对不同种类的氨基酸克分子消光系数不同。在酸性条件下测定的最大优点是不同种类氨基酸的克分子消光系数基本上一致,但必须有紫外分光光度计。此外,某些氨基酸如色氨酸、赖氨酸经 TNBS 反应后在酸性条件下产生沉淀而不能测定。

(2) TNBS 法定量测定氨基酸与常用的茚三酮法比较有以下优点:灵敏度与茚三酮法大致相当,若添加 SO_3^{2-} ,还超过后者,反应条件简单,无需加温及添加有机溶剂;试剂也不必经特殊处理,不需加还原剂,茚三酮法中往往由于还原不当而严重影响显色反应。由于 TNBS 与 NH_4^+ 及脲不起反应,不会象茚三酮那样会受到这些物质的干扰。光密度达 1.5 仍与浓度呈良好的线性关系。

TNBS 法的缺点是与脯氨酸几乎不起反应。

(3) TNBS 与二硝基氟苯不同,它主要与氨基酸中的伯氨基起反应,不与组氨酸的咪唑基,酪氨酸的羟基及精氨酸的胍基起作用,与脯氨酸的仲氨基也几乎不作用。除氨基外, TNBS 也能很快与半胱氨酸的巯基起反应,但在偏碱条件下巯基本身也很容易氧化成二硫键。因此欲避免样品中巯基对 TNBS 反应的干扰,可先在碱性溶液中 30℃ 保温数小时,使巯基都氧化成二硫键,然后再与 TNBS 起反应,这样就可定量测定样品中的氨基含量。

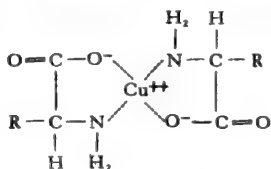
(4) TNBS 与氨基酸中 α -氨基的反应速度决定于溶液中的 pH 值,当 pH 低于 6.2 时几乎不起反应,随着 pH 值升高,反应速度加快。pH 大于 11 时反应迅速,在 2—3 分钟内即完成,但 TNBS 本身的破坏也加快,空白提高,因而一般取 pH9—10 为宜,通常用 1% NaHCO_3 溶液较理想。

(5) TNBS 与不同性质氨基酸的反应速度不同,与碱性氨基酸的反应较快,在40℃30分钟内反应即完成,而这时酸性氨基酸的反应还不到一半。提高温度可使反应速度加快,但 TNBS 本身破坏也显著,空白也提高。因此一般不采用升高温度,而是延长反应时间。在 40℃ 保温 2 小时对各种氨基酸的反应均可完全,这时空白本身在 420nm 处的光密度约在 0.15 左右(对蒸馏水测定)。

(三) 铜复合物紫外吸收法^[46]

原理

在合适的 pH 条件下,二分子 α-氨基酸与一分子铜离子形成氨基酸-铜复合物:



此复合物呈蓝色,除了在 620nm 有吸收峰外,在 230nm 有最大吸收,其克分子消光系数在 230nm 处为 620nm 处的 100 倍左右,因此利用氨基酸-铜复合物的紫外吸收可以进行氨基酸的微量测定。

本法可允许的测定范围是 50—500 微克分子/毫升的氨基酸。适用于蛋白质水解速度和水解程度的测定。

试剂

1. 0.05M 氯化铜溶液 825 毫克氯化铜 ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 加蒸馏水至 1000 毫升。
2. 硼酸钠溶液 (pH9.1—9.2) 10.1 克无水四硼酸钠加入 1 升蒸馏水, 过滤。每 100 毫升硼酸钠溶液中加入 6 克氯化钠。
3. 氨基酸标准溶液 配制成 500 微克分子/毫升的水溶液。

操作步骤

(1) 在离心管中加 5 毫升硼酸钠溶液, 5 毫升氨基酸样品液(每毫升含 50—500 微克分子氨基酸), 再加 0.1 毫升氯化铜溶液, 充分摇匀, 室温(全部测定在恒定温度 $\pm 1^\circ\text{C}$ 范围内)放置 10 分钟, 悬浮液离心 (3000 转/分) 5 分钟, 将上清液小心倾倒在另一清洁试管中, 取上清液在 230nm 测定。空白管以蒸馏水代替氨基酸样品液。

(2) 标准曲线制作: 分别取 500 微克分子/毫升氨基酸标准溶液 1、2、3、4 及 5 毫升, 各补加蒸馏水至 5 毫升, 其他操作步骤同样品。

讨论

(1) 由于过量氯化铜的存在, 使氨基酸-铜复合物不稳定, 在操作过程中应及时离心并除去过量的铜盐沉淀物。由于测定的灵敏度较高, 应避免试剂、蒸馏水、容器含有少量的铜及氨基酸。

(2) 各种氨基酸的铜复合物在 230nm 的相对值%为: 丙氨酸 100, 精氨酸 103.3, 天冬氨酸 96.9, 半胱氨酸 80.9, 谷氨酸 103.8, 甘氨酸 100.2, 组氨酸 83.5, 羟脯氨酸 91.1, 异

亮氨酸 102.7, 亮氨酸 103.9, 赖氨酸 98.9, 甲硫氨酸 102.6, 苯丙氨酸 91.1, 脯氨酸 83.5, 苏氨酸 100.7, 色氨酸 144.1, 酪氨酸 94.7, 缬氨酸 101.5。

(3) 500 微克分子的葡萄糖、蔗糖、甘露糖醇、肌醇或氯化钠没有明显干扰。

(4) 蛋白质水解时,随着水解过程中肽链的切断,水解产物与铜复合物的最大吸收的波长不断向长波长方向移动,当水解成氨基酸时,其铜复合物的最大吸收值上升到 230nm 左右时,水解达到完全。因此本法适用于蛋白质水解速度和水解程度的测定。

(四) 邻苯二甲醛法^[17]

邻苯二甲醛与氨基酸生成荧光物质,可用于测定游离氨基酸的含量。灵敏度较茚三酮法约高 100 倍以上,可测到 $0.1 - 1 \times 10^{-9}$ 克分子氨基酸。如用于血清中 α -氨基氮的测定,每次血清用量只需 5—10 微升。与另一种荧光试剂(萤光胺)一样,空白无荧光,只有与氨基酸接合才产生荧光。缺点是与脯氨酸不产生荧光,邻苯二甲醛与半胱氨酸荧光值太低。萤光胺已有用于氨基酸自动分析仪定量分析,但由于试剂昂贵及个别氨基酸反应不满意,目前还未普遍应用。

原理

参见 45 页。

试剂

1. 硼酸钠缓冲液 (100mM) 称取硼酸钠 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 38 克,氢氧化钠约 3.4 克,加重蒸水 800 毫升,调至 pH9.8—10.0,加水至 1000 毫升。

2. 邻苯二甲醛溶液(简称 OPT) 每升含 1mmole 邻苯二甲醛, 2mmole β -巯基乙醇,临用前配制。称取 13.4 毫克邻苯二甲醛溶于 1 毫升无水乙醇,加 0.2 毫升 β -巯基乙醇-无水乙醇溶液 (0.15 毫升 β -巯基乙醇加无水乙醇至 2 毫升,吸取 0.2 毫升),再加硼酸钠缓冲液至 100 毫升,如不立即应用,宜避光及冰浴保存,防止 β -巯基乙醇破坏。

3. 0.6N 三氯醋酸溶液 称取三氯醋酸 9.8 克,加重蒸水 100 毫升。0.06N 三氯醋酸溶液: 由 0.6N 稀释 10 倍。

4. 标准氨基酸溶液 精确称取经真空干燥 24 小时的标准氨基酸 0.1 毫克分子于 100 毫升容量瓶中,先加少量重蒸水,待完全溶解后加水至 100 毫升,为 1mM 溶液。

操作步骤

以血清中游离氨基酸测定为例。

(1) 血清的去蛋白处理: 血清或肝素血的血浆加等体积 0.6N 三氯醋酸,混匀,静置 10 分钟后,3000—4000 转/分离心 10 分钟。取上清液用水稀释五倍,相当于原血清的 10 倍稀释液。

(2) 分别吸取: 每组两份。

A. 测定管: 稀释 10 倍的血清上清液 100 微升,加水至 300 微升;

B. 标准管: 1mM 谷氨酸标准溶液 25 微升,加 0.06N 三氯醋酸 100 微升,加水至 300 微升;

C. 空白管: 0.06*N* 三氯醋酸 100 微升, 加水至 300 微升。

(3) 分别加 3 毫升 OPT 溶液于上述样品中, 迅速摇匀, 立即进行荧光测定。使用荧光分光光度计, 激发光波长 340nm, 发射光波长 455nm。(预热 20—30 分钟后开始测试。)

计算

根据下列公式计算游离 α -氨基酸值 (glu 值):

$$\alpha\text{-氨基酸(毫克分子/升)} = \frac{\text{测定管值} - \text{空白管值}}{\text{标准管值} - \text{空白管值}} \times 2.5$$

讨论

(1) 测定 $0-25 \times 10^{-8}$ 克分子谷氨酸标准溶液 (相当于 1mM 标准谷氨酸溶液 0—250 微升) 的谷氨酸含量相对荧光标准曲线符合于抛物线 (回归方程式为 $g = 1.47 + 15.86x - 0.62x^2$), 因曲线的下部 (约 $0-5 \times 10^{-8}$ 克分子) 接近于直线, 为方便计可按直线关系计算测定值, 但当样品浓度较高时应予稀释, 使测定管值和标准管值互相接近以减少误差。

(2) 尿素、尿酸、肌酐和氨等几乎不与邻苯二甲醛产生荧光物质, 所以对游离氨基酸的测定没有干扰。

(3) 邻苯二甲醛对半胱氨酸、胱氨酸和赖氨酸等的荧光值偏低, 对脯氨酸不作用。血清中这类氨基酸含量不多, 对整个测定影响不大。

(4) 血清中游离氨基酸量以谷氨酸值表示, 是由于它所生成的荧光物稳定性好, 且因谷氨酸本身比较稳定、价廉, 容易得到。

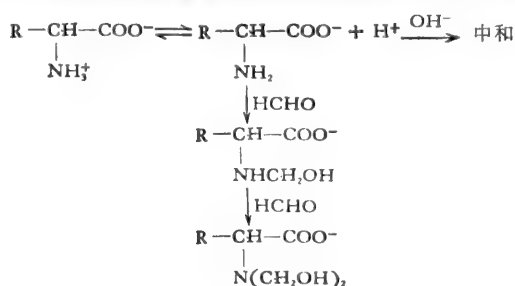
(5) 蛋白质沉淀剂, 如三氯醋酸、硫酸-钨酸钠均有降低荧光的作用。不加三氯醋酸, 荧光值平均可高 5.38%。因此血清取样体积不宜过大, 对照用的标准氨基酸液需加相同体积沉淀剂, 以减少误差。

(6) 由于荧光法十分灵敏, 对操作及试剂的要求都必须严格, 所用各种玻璃器皿要洗涤干净, 测定时比色槽壁上不能留有指印。测定液必须透明清晰。因紫外光照射能使荧光逐渐下降, 在重调仪器时需采用临时新配标准谷氨酸液对照测定, 才能得到精确的结果。

(五) 甲醛滴定法^[18]

原理

氨基酸的 $-NH_3^+$ 基的 pK 值常在 9.0 以上, 不能用一般指示剂作酸碱滴定测定。然而, 甲醛可与氨基酸中不带电荷的氨基相互作用, 促使 $-NH_3^+$ 上的氢离子释放。



在 pH 中性和常温条件下,甲醛迅速与氨基酸上的氨基(或亚氨基)结合,使上述平衡向右移动,促进氢离子释放,从而使溶液酸度增加。这样就可利用酚酞作指示剂,以氢氧化钠来滴定。每释放出一个氢离子,就相当于有一个氨基氮,因而从滴定所用氢氧化钠量可以计算样品中氨基氮的含量,也就可以算出氨基酸含量。

试剂

(1) 中性甲醛溶液: 在 50 毫升 36—37% 甲醛中加入 1 毫升 0.1% 酚酞指示剂,然后用 0.2N 氢氧化钠滴定到微红。要临用前配制,若放置一些时间后,在使用前要重新进行中和。

(2) 酚酞指示剂: 0.1% 酚酞的 50% 乙醇溶液。

(3) 标定的 0.010N 或 0.100N 氢氧化钠溶液。

操作步骤

1. 第一种方法 于锥形瓶中加入 1 毫升样品液(氨基酸浓度约 0.01N), 2 毫升蒸馏水及 3 滴 0.1% 酚酞指示剂,摇匀后,用氢氧化钠溶液滴定到微红色,然后加入 1 毫升中性甲醛溶液,放置片刻,再用微量滴定管以 0.010N 氢氧化钠溶液滴定到微红色终点,记下加甲醛后所消耗的碱量(A)。同样,空白测定耗碱量(B)。

2. 第二种方法 精确称取一定量样品(含氨基酸约 0.15 毫克左右),在锥形瓶中加入 20 毫升蒸馏水溶解后,在 pH 计上测定 pH,用氢氧化钠溶液调节到 pH7,加 10 毫升中性甲醛溶液,放置片刻,再用 0.01N 氢氧化钠溶液滴定到 pH9.0,记下加甲醛后所消耗的碱量(A)。同样,空白测定耗碱量(B)。

计算

$$\text{氨基酸含量(毫克/毫升或毫克)} = \frac{(A - B) \times N_{\text{NaOH}} \times M_{\text{A.A.}}}{V \text{ (或 } W \text{)}}$$

式中, A、B 分别为样品及空白加甲醛后消耗的氢氧化钠溶液的毫升数; N_{NaOH} 为标定的氢氧化钠溶液的当量浓度; $M_{\text{A.A.}}$ 为被测定的氨基酸的分子量(如按氨基氮计算,可取 N 原子量 14.008); V 或 W 为被测样品的毫升数或毫克数。

讨论

本法一般所采用的甲醛浓度是 2—3M, 即最终浓度为 6—9%。

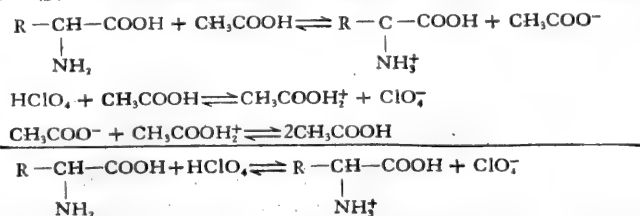
本法的优点是简单快速,可以用于快速测定氨基酸含量,也常用来测定蛋白质水解的程度。缺点是不够精确,其准确度仅达到氨基酸理论含量的 90%。

(六) 非水溶液滴定法^[19]

原理

氨基酸的非水溶液滴定法是氨基酸在冰醋酸中用高氯酸的标准溶液滴定其含量。根据酸碱的质子学说: 一切能给出质子的物质为酸,能接受质子的物质为碱;弱碱在酸性溶剂中碱性显得更强,而弱酸在碱性溶剂中酸性显得更强,因此本来在水溶液中不能滴定的

弱酸或弱碱,如果选择适当的溶剂使其强度增加,则可以顺利地滴定。氨基酸有氨基和羧基,在水中呈现中性,假如在冰醋酸中就显示出碱性,因此可以用高氯酸等强酸进行滴定



本法适合于氨基酸成品的含量测定。允许测定的范围是几十毫克的氨基酸。

试剂

1. 0.100N 高氯酸标准液 8.4 毫升 72% 高氯酸溶液,加入预先放有 400 毫升冰醋酸的 1 升容量瓶中,加入 20 毫升醋酸酐以除 70% 高氯酸中含有的少量水份(注意不要将醋酸酐直接注入高氯酸中),然后以冰醋酸稀释到 1 升,放置过夜,用基准邻苯二甲酸氢钾标定之。

标定法: 精确称取干燥至恒重的邻苯二甲酸氢钾(标准试剂,分子量 204.24) 0.8000 克,置 250 毫升锥形瓶中,加入 80 毫升冰醋酸,加热溶解后,加 5 滴 1% 甲基紫指示剂,用上述高氯酸溶液滴定到紫色刚消失为止,耗去 V 毫升。

$$N_{\text{HClO}_4} = \frac{W}{V \times \frac{204.24}{1000}}$$

2. 1% 甲基紫指示剂 0.2 克甲基紫溶解于 20 毫升冰醋酸中。

3. 0.1N 醋酸钠溶液 8.2 克无水醋酸钠溶解于冰醋酸中,并用冰醋酸定容至 1 升。可用上述高氯酸标准溶液标定其精确浓度。

操作步骤

1. 直接法(适用于能溶解于冰醋酸的氨基酸) 精确称取氨基酸样品 50 毫克左右,溶解于 20 毫升冰醋酸中,加 2 滴甲基紫指示剂,用高氯酸标准液滴定(用 10 毫升体积的微量滴定管),终点为紫色刚消失,呈现蓝色。空白管为不含氨基酸的冰醋酸液,滴定至同样终点颜色。

$$\text{氨基酸含量}\% = \frac{V_{\text{HClO}_4} \times N_{\text{HClO}_4} \times M_{\text{A.A.}}}{W} \times 100\%$$

式中 V_{HClO_4} , N_{HClO_4} 分别为所耗用的高氯酸标准液的体积(毫升)和当量浓度, $M_{\text{A.A.}}$ 和 W 分别为被测氨基酸的分子量和重量(毫克)。

2. 回滴法(适用于不易溶解于冰醋酸而能溶解于高氯酸的氨基酸) 精确称取氨基酸样品 30—40 毫克左右,溶解于 5 毫升高氯酸标准液中,加 2 滴甲基紫指示剂,剩余的酸以醋酸钠溶液滴定,颜色变化由黄,经过绿、蓝至初次呈现不褪的紫色为终点。

$$\text{氨基酸含量}\% = \frac{(V_{\text{HClO}_4} \times N_{\text{HClO}_4} - N_{\text{NaAC}} \times V_{\text{NaAC}}) \times M_{\text{A.A.}}}{W} \times 100\%$$

* 含有两个氨基的氨基酸,如赖氨酸、胱氨酸和精氨酸在此计算式中还应该除以 2。

式中 V_{NaAC} , N_{NaAC} 分别为滴定耗用醋酸钠溶液的体积(毫升)和当量浓度, V_{HClO_4} , N_{HClO_4} 分别为高氯酸标准液的体积(毫升)和当量浓度, $M_{\text{A.A.}}$ 和 W 分别为被测氨基酸的分子量和重量(毫克)。

讨论

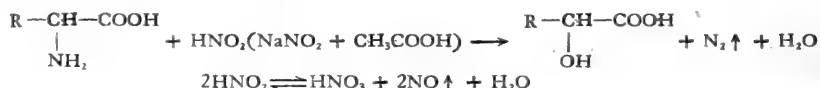
(1) 能溶解于冰醋酸的氨基酸, 可以用直接法测定的有: 丙氨酸、精氨酸、甘氨酸、组氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和苏氨酸。不易溶解于冰醋酸, 但能溶解于高氯酸可以用回滴法测定的有: 赖氨酸、丝氨酸、胱氨酸和半胱氨酸。

(2) 谷氨酸和天冬氨酸在高氯酸溶液中也不能溶解, 可以将样品溶解于 2 毫升甲酸中, 再加 20 毫升冰醋酸, 直接用标准的高氯酸溶液滴定。

(七) 量气法^[20]

原理

用量气法测定氨基酸, 是利用亚硝酸可以与含有游离 α -氨基的氨基酸起反应, 氨基酸被氧化成羧酸, 并定量地放出氮气。



以高锰酸钾碱性溶液吸收反应过程中由亚硝酸分解所生成的氮的氧化物:



然后可以测定生成氮气的体积。因为分离出来的氮只有一半是从氨基酸的游离氨基分解的, 所以应将得到的氮量用 2 除, 再将其换算成标准状态下的数值, 即可计算出待测溶液中氨基氮的量。所生成的氮的体积是在一种专门设计的 Van Slyke 仪器中测定的。

试剂和仪器

- (1) 30% 亚硝酸钠溶液, 用前临时配制, 在 30℃ 水浴中预热后取用。
- (2) 80% 醋酸溶液或冰醋酸。
- (3) 碱性高锰酸钾溶液: 50 克高锰酸钾及 25 克氢氧化钠溶于 1 升蒸馏水中。
- (4) 活塞用的润滑剂: 羊毛脂或由凡士林与橡胶制成的润滑剂(在水浴上熔化一份重的切碎的无硫橡胶及五份重的凡士林即得)。

(5) Van Slyke 仪器结构: (图 3.1)

此仪器主要由反应器(B)、量气管(D)和气体吸收瓶(G)三部分构成。

反应器(B)一侧借活塞 a 与漏斗(A)相通, 另一侧与加样管(C)相通。反应器的下端有一活塞 b 可以由此排出反应过的废液。在反应器的上端狭窄处的上面有一扩大部分, 再向上则拉成毛细管并弯曲成“T”形, 在中央有一个三通活塞 c, 以使反应器经由毛细管与量气管(D)相通, 或使反应器或量气管与外界相通。

量气管(D)的扩大部下端成一细管, 在此细管上套着一根长约一米的橡皮管, 橡皮管的末端连有一梨形瓶(E), 梨形瓶是用来把水灌入仪器及排除量气管中的气体。在量

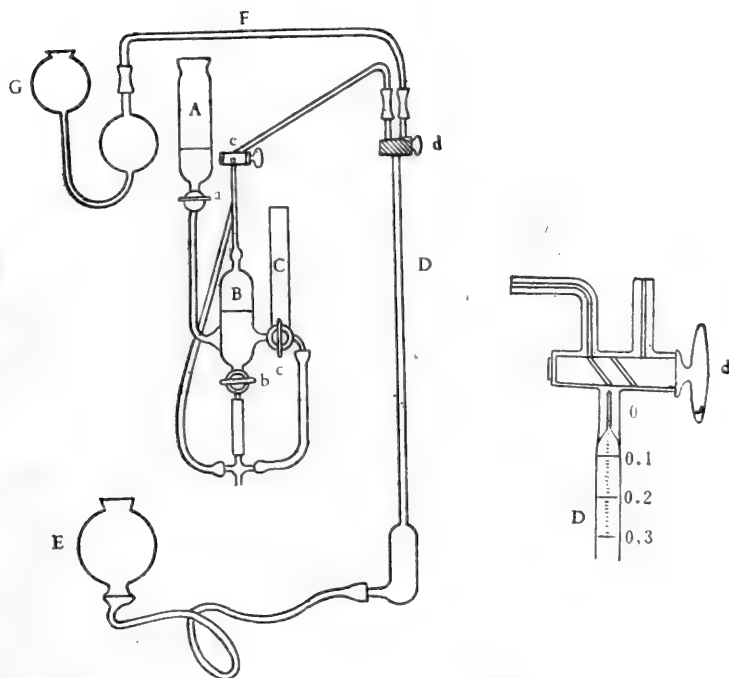


图 3.1 Van Slyke 仪器简图

气管的上端有一带有二个平行通路的活塞 d，借此使量气管与反应器相通，或经过连接管 (F) 与吸收瓶 (G) 相通。

吸收瓶 (G) 是由二个储有碱性高锰酸钾溶液的圆形玻璃球以一个弯管相通而组成的，上面的一个吸收瓶内装有 $\frac{1}{4} - \frac{1}{3}$ 容积的碱性高锰酸钾溶液。连接管 (F) 二端用橡皮管与量气管及吸收瓶连接。

操作步骤

1. 测定前仪器准备 把仪器的各部分洗涤干净，然后按次序将各部分连接安装在大铁架上。用橡皮管联接起来的仪器的玻璃部分应当彼此直接接触，各活塞均应仔细涂以润滑剂，在涂润滑剂前，活塞与活塞套应以乙醚将油脂除去，然后再用手指在活塞上很均匀地薄薄地涂一层润滑剂，把活塞仔细旋入活塞套，当活塞旋入后，应该是完全透明而无条纹，并以橡皮圈加以固定。

梨形瓶 (E) 中装入用硫酸酸化过的水。将活塞 d 及 e 置于量气管与外界相通的位置，提高梨形瓶 (E) 使水充满量气管 (D)，注意勿使橡皮管内留有气泡，量气管充满水后，把活塞 d 关闭。

将碱性高锰酸钾溶液加入上面一个吸收瓶中，使活塞 d 连通量气管和吸收瓶，并且将梨形瓶 (E) 下降，以使碱性高锰酸钾溶液流入下面一个吸收瓶，进而流向连接管 (F) 中。当碱性高锰酸钾溶液充满吸收瓶和连接管 (F)，并出现于量气管内时，使活塞 d 与外界相通，然后提高梨形瓶 (E)，除去量气管中的碱性高锰酸钾溶液，立即关闭活塞 e。

2. 排除空气

第一种方法：将活塞 e 置于使反应器与外界相通的位置，关闭活塞 a, b 及 c，于漏斗

(A) 中加入 80% 醋酸溶液到下面刻度处, 并打开活塞 a, 使其流入反应器 (B) 内, 然后再将活塞 a 关闭, 于漏斗 (A) 内加入 30% 亚硝酸钠至上面刻度处, 并同样地把它引入反应器中(亚硝酸钠溶液与醋酸的体积比是 4:1, 可用 3.5 毫升醋酸溶液, 1.4 毫升亚硝酸钠溶液)。按照漏斗 (A) 下面刻度的位置, 将醋酸溶液放入反应器 (B) 中时, 应充满反应器体积的 1/3; 而按照上面刻度的位置加入亚硝酸钠溶液应充满反应器 (B) 后, 在 (A) 中还留有少量的亚硝酸钠溶液。当液体充满反应器后, 立即关闭活塞 c。摇动反应器, 在亚硝酸钠与醋酸作用的过程中所生成的氮的氧化物将驱使液体流入漏斗 (A) 中(活塞 a 是开着的), 当氮的氧化物使反应器中液体降低到刻度以下时, 即转动活塞 c 使与外界相通, 此时反应器 (B) 重新为漏斗 (A) 中的液体所充满, 并适当倾斜反应器, 以使液体上升到反应器的毛细管部分, 关闭活塞 c。再重复此操作 2—3 次, 这样氮的氧化物逐渐将仪器中的空气排出。

第二种方法: 按第一种方法将亚硝酸钠溶液和醋酸溶液加好后, 转移活塞 c 使反应器与量气管 (D) 相通, 降低梨形瓶 (E), 使反应液充满反应器及上面毛细管部分, 立即转动活塞 c 使量气管与外界相通。提高梨形瓶 (E), 用水将量气管中的气体排出。随之将活塞 c 关闭。转动反应器, 所产生的氮的氧化物将液体压入漏斗 (A) 中, 当反应产生的气体充满反应器后, 降低梨形瓶 (E), 同时打开活塞 c 使反应器与量气管相通, 反应混合液重新进入反应器并进而到达活塞 d 时, 转动活塞 c, 使与外界相通, 将量气管中的气体排出, 然后关闭活塞 c。此操作再重复 2 次, 将仪器中空气除尽。

3. 样品的测定 在氮的氧化物充满反应器后, 将活塞 a 关闭。梨形瓶 (E) 移到与量气管 (D) 下端液面相应的位置处。转动活塞 c, 使反应器与量气管相通。

小心转动活塞 c 与外界相通, 在加样管 (C) 上端接一橡皮管, 把待测液置于一小烧杯中, 然后通过活塞 c 下面的弯管。将待测液吸入加样管 (C), 要使活塞 c 的孔内充满待测液(注意勿使其中留有气泡), 再把加样管 (C) 使与反应器 (B) 相通, 加入 1 或 2 毫升待测液(约含 25 微克分子/毫升氨基酸溶液), 关闭活塞 c。必须注意, 在将待测液放入反应器内时, 切不可带有气泡, 否则实验即为无效。不断摇动反应器 (B), 在反应过程中生成的氮及氮的氧化物气体, 由于负压均逸入量气管 (D) 中。如果此时生成的气体较多, 达到量气管下端扩大部分, 甚至达到橡皮管内时, 应当停止摇动。转动活塞 d, 使与吸收瓶相连。提高梨形瓶 (E) 使气体逸入吸收瓶中, 然后再转动活塞 d 和反应器 (B) 相通, 降低梨形瓶 (E) 再继续摇动。5 分钟后, 打开活塞 a, 使漏斗中的液体流入反应器 (B) 中, 降低梨形瓶使反应器中液面到达活塞 d 处, 使量气管 (F) 与吸收瓶 (G) 相通, 这时气体就开始经过连接管 (F) 到吸收瓶 (G) 中, 当所有气体都自量气管逸入吸收瓶后(即量气管中的液体应当出现在较低的一个吸收瓶中), 关闭活塞 d, 摇动吸收瓶 1—2 分钟, 此时氮的氧化物即被碱性高锰酸钾溶液所吸收。打开活塞 d 使吸收瓶与量气管相通, 降低梨形瓶 (E), 可观察到气体由吸瓶中慢慢出来, 使气体全部转移到量气管 (D) 中, 立即关闭活塞 d, 移动梨形瓶使其液面与量气管液面相平(即在当时大气压下测量气体体积), 读出气体体积。再重新将气体压回吸收瓶, 再次吸收, 二次数据符合, 否则再重复 1—2 次。这样便完成了一次样品测定。

实验操作完毕后, 转动活塞 d 及 c, 分别与外界相通。提高梨形瓶, 用水将气体自量气管排出, 并将其中高锰酸钾洗净。再转动活塞 d 与吸收瓶 (G) 相通, 提高梨形瓶, 把

(F) 管中的高锰酸钾洗净,并充满水,关闭活塞 d。将活塞 a、b 的活塞打开,让液体从漏斗(A)及反应器(B)中流出,用水将漏斗、反应器及加样管洗净,并装满水。

空白实验以等体积蒸馏水代替待测液,进行同样的测定。

计算

由于 1 克分子气体在标准状态下(0℃ 及 760 毫米汞柱压力)所占的体积为 22.4 升,因此可从测量出的气体体积中计算出待测液中的氨基氮量。为此将测定样品时所读出的气体体积与空白实验所得体积的差数除以 2,即得由于氨基酸氨基的分解所生成的气体体积,再用下面公式换算成标准状态时的气体体积。

$$V_0 = V \frac{(P - f) \times 273}{760 \times (273 + t)}$$

式中, V 为气压 P 及温度 $t^\circ\text{C}$ 时的气体体积; P 为在进行实验时气压计所指示的压力; t 为在实验进行时的温度; f 为温度 $t^\circ\text{C}$ 时的饱和蒸气压; V_0 为标准状态下的气体体积。

样品中氨基氮量(毫克)应为 $x = 1.2508V_0$, 其中 1.2508 为 1 毫升干燥氮气的毫克数。

为了便于计算,由表 3.2 可以直接查出在压力 P 和温度 $t^\circ\text{C}$ 时,用集气排水法收集 1 毫升氮的重量。将氨基酸氨基分解所形成的氮的体积 V , 乘以表内查出的数值,即可求出所测样品中氨基酸的量。

(八) 酰胺氮测定法^[2]

原理

蛋白质分子内双羧基氨基酸(谷氨酰胺、天冬酰胺)的侧链上含有酰胺基。蛋白质总氮的三个组成部分—— α -氨基、某些特殊基团上的氮和酰胺氮中,酰胺基上的氮比较容易释放,在较温和或短时间的条件下,即可释放完全。由于酰胺氮比总氮少得多,用微量克氏定氮法往往需要消耗较多的样品,所以常常采用微量弥散法。



酸水解后的蛋白质样品在弥散碟的外室与碱液混合,氨被释放出来,经过弥散,吸收于中央室含有指示剂的酸溶液中。反应完全后,直接在中央室用标准盐酸滴定,即可标出酰胺氮的含量。

仪器和试剂

1. 微量弥散皿(Conway) 是由白瓷制成,分成中央及外围两室,外围上沿周围齐平磨砂,中圈则稍低。(图 3.2)

2. 微量滴定管(图 3.3) 由毛细管做成。一端拉尖便于滴定,一端套一小段橡皮管,便于吸取溶液。毛细管固定于一标尺上。滴定管需用水银标定,标定时在橡皮管的一端套一支 5 毫升针筒以便吸收水银,从 $D = M/V$ (D 为密度, M 为重量, V 为体积)求得每一厘米毛细管的真实体积。由于毛细管的内径往往并不完全均一,所以需要每 1 厘米逐段标定,并将标定结果列成一表,在滴定时就可以从表查得滴定所用的体积。微量滴

表 3.2 在不同温度 (10~30℃) 及压力 (720~772 毫米汞柱) 下 1 毫升气态氮相当于氨基氮的毫克数

温度 (°C) 压力 (毫米汞柱)	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
720	0.5640	0.5615	0.5590	0.5565	0.5540	0.5515	0.5490	0.5465	0.5440	0.5410	0.5385	0.5360	0.5330	0.5305	0.5275	0.5245	0.5220	0.5190	0.5160	0.5135	0.5100
722	0.5655	0.5635	0.5610	0.5580	0.5555	0.5530	0.5505	0.5480	0.5455	0.5425	0.5400	0.5375	0.5345	0.5320	0.5290	0.5260	0.5235	0.5215	0.5175	0.5150	0.5115
724	0.5675	0.5650	0.5625	0.5600	0.5570	0.5545	0.5525	0.5495	0.5470	0.5440	0.5415	0.5390	0.5360	0.5335	0.5315	0.5275	0.5250	0.5220	0.5190	0.5175	0.5130
726	0.5690	0.5665	0.5640	0.5615	0.5590	0.5560	0.5535	0.5510	0.5485	0.5445	0.5430	0.5405	0.5375	0.5350	0.5320	0.5290	0.5260	0.5235	0.5200	0.5180	0.5145
728	0.5705	0.5680	0.5655	0.5630	0.5605	0.5580	0.5555	0.5525	0.5500	0.5475	0.5445	0.5420	0.5395	0.5365	0.5335	0.5310	0.5280	0.5250	0.5220	0.5195	0.5160
730	0.5720	0.5695	0.5670	0.5645	0.5620	0.5595	0.5570	0.5540	0.5515	0.5490	0.5460	0.5435	0.5410	0.5380	0.5350	0.5325	0.5295	0.5255	0.5235	0.5210	0.5175
732	0.5735	0.5710	0.5685	0.5660	0.5635	0.5610	0.5585	0.5555	0.5530	0.5505	0.5475	0.5450	0.5425	0.5395	0.5365	0.5340	0.5310	0.5280	0.5250	0.5220	0.5190
734	0.5755	0.5725	0.5700	0.5675	0.5650	0.5625	0.5600	0.5575	0.5545	0.5520	0.5495	0.5465	0.5440	0.5410	0.5380	0.5355	0.5325	0.5295	0.5265	0.5235	0.5205
736	0.5770	0.5745	0.5720	0.5695	0.5665	0.5640	0.5615	0.5590	0.5560	0.5535	0.5510	0.5480	0.5455	0.5425	0.5400	0.5370	0.5340	0.5310	0.5280	0.5250	0.5220
738	0.5785	0.5760	0.5735	0.5710	0.5680	0.5655	0.5630	0.5605	0.5580	0.5550	0.5525	0.5495	0.5470	0.5440	0.5415	0.5385	0.5355	0.5325	0.5295	0.5265	0.5235
740	0.5800	0.5775	0.5750	0.5725	0.5700	0.5670	0.5645	0.5620	0.5595	0.5565	0.5540	0.5510	0.5485	0.5455	0.5430	0.5400	0.5370	0.5340	0.5310	0.5280	0.5250
742	0.5815	0.5790	0.5765	0.5740	0.5715	0.5685	0.5660	0.5635	0.5610	0.5580	0.5555	0.5525	0.5500	0.5470	0.5445	0.5415	0.5385	0.5355	0.5325	0.5295	0.5265
744	0.5830	0.5805	0.5780	0.5755	0.5730	0.5705	0.5675	0.5650	0.5625	0.5595	0.5570	0.5540	0.5515	0.5485	0.5460	0.5430	0.5400	0.5370	0.5340	0.5310	0.5280
746	0.5850	0.5820	0.5795	0.5770	0.5745	0.5720	0.5690	0.5665	0.5640	0.5610	0.5585	0.5555	0.5530	0.5500	0.5475	0.5445	0.5415	0.5385	0.5355	0.5325	0.5295
748	0.5865	0.5840	0.5815	0.5785	0.5760	0.5735	0.5710	0.5680	0.5655	0.5630	0.5600	0.5575	0.5545	0.5515	0.5490	0.5460	0.5430	0.5400	0.5370	0.5340	0.5310
750	0.5880	0.5855	0.5830	0.5805	0.5775	0.5750	0.5725	0.5695	0.5670	0.5645	0.5615	0.5590	0.5560	0.5530	0.5505	0.5475	0.5445	0.5415	0.5385	0.5355	0.5325
752	0.5895	0.5870	0.5845	0.5820	0.5790	0.5765	0.5740	0.5710	0.5685	0.5660	0.5630	0.5605	0.5575	0.5545	0.5520	0.5490	0.5460	0.5430	0.5400	0.5370	0.5340
754	0.5910	0.5885	0.5860	0.5835	0.5805	0.5780	0.5755	0.5730	0.5700	0.5675	0.5645	0.5620	0.5590	0.5560	0.5535	0.5505	0.5475	0.5445	0.5415	0.5385	0.5355
756	0.5925	0.5900	0.5875	0.5850	0.5825	0.5795	0.5770	0.5745	0.5715	0.5690	0.5660	0.5635	0.5605	0.5575	0.5550	0.5520	0.5490	0.5460	0.5430	0.5400	0.5370
758	0.5945	0.5915	0.5890	0.5865	0.5840	0.5810	0.5785	0.5760	0.5730	0.5705	0.5675	0.5650	0.5620	0.5595	0.5565	0.5535	0.5505	0.5475	0.5445	0.5415	0.5385
760	0.5960	0.5935	0.5905	0.5880	0.5855	0.5830	0.5800	0.5775	0.5745	0.5720	0.5690	0.5665	0.5635	0.5610	0.5580	0.5550	0.5520	0.5490	0.5460	0.5430	0.5400
762	0.5975	0.5950	0.5925	0.5895	0.5870	0.5845	0.5815	0.5790	0.5765	0.5735	0.5705	0.5680	0.5650	0.5625	0.5595	0.5565	0.5535	0.5505	0.5475	0.5445	0.5415
764	0.5990	0.5965	0.5940	0.5910	0.5885	0.5860	0.5830	0.5805	0.5780	0.5750	0.5725	0.5695	0.5665	0.5640	0.5610	0.5580	0.5550	0.5520	0.5490	0.5460	0.5430
766	0.6005	0.5980	0.5955	0.5930	0.5900	0.5875	0.5850	0.5820	0.5795	0.5765	0.5740	0.5710	0.5680	0.5655	0.5625	0.5595	0.5565	0.5535	0.5505	0.5475	0.5445
768	0.6025	0.5995	0.5970	0.5945	0.5915	0.5890	0.5865	0.5835	0.5810	0.5780	0.5755	0.5725	0.5695	0.5670	0.5640	0.5610	0.5580	0.5550	0.5520	0.5490	0.5460
770	0.6040	0.6010	0.5985	0.5960	0.5935	0.5905	0.5880	0.5850	0.5825	0.5795	0.5770	0.5740	0.5715	0.5685	0.5655	0.5625	0.5595	0.5565	0.5535	0.5505	0.5475
772	0.6060	0.6030	0.6000	0.5975	0.5950	0.5920	0.5895	0.5865	0.5840	0.5810	0.5785	0.5755	0.5730	0.5700	0.5670	0.5645	0.5610	0.5580	0.5550	0.5520	0.5490

定管一般为40厘米,每厘米体积约4—5微升。

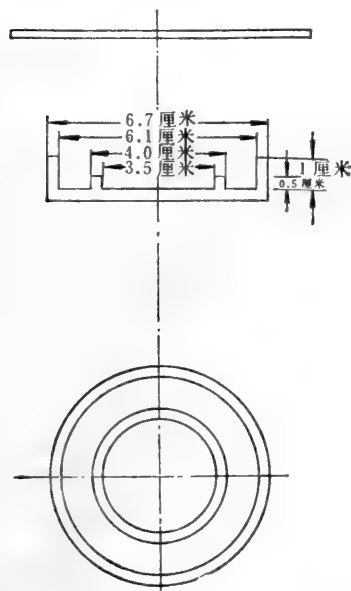


图 3.2 微量弥散皿

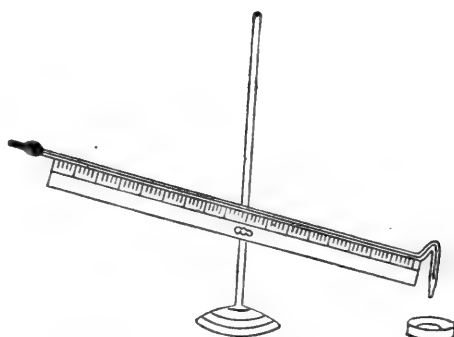


图 3.3 微量滴定管

3. 1% 硼酸溶液 10 克硼酸 (G. R.) 溶解于无氨蒸馏水中, 稀释至 1000 毫升。

4. 吸收剂 33 毫克溴甲酚绿及 66 毫克甲基红一起溶于乙醇, 并稀释至 100 毫升。将此混合指示剂 2 毫升加入一干净的 100 毫升容量瓶中, 加入 1% 硼酸至接近刻度, 并以几滴稀碱调节至灰红色, 再以 1% 硼酸定容至刻度, 保存备用。

5. 水溶性胶的调制 10 克阿拉伯胶与 15 毫升水, 5 毫升甘油及 5 克碳酸钾在研钵中研磨均匀, 置真空干燥器内, 减压并放置一星期后就可应用。若浓度太大, 可用水稀释至适当浓度。

6. 12N 盐酸

7. 40% 氢氧化钾

8. 0.02N 盐酸(标定)

操作步骤

1. 样品的酸水解 1 毫升已知浓度 (0.5—1%) 的蛋白质溶液与 0.25 毫升的 12N 盐酸混和, 再加入 0.25 毫升水, 封于硬质玻管中, 在 125—130℃ 水解 3 小时。水解完毕, 取出待冷, 打开玻管, 适当稀释使其含氮量约为 50—70 微克/微升。

2. 氮的释放及测定 在微量弥散皿的中央加 0.5 毫升吸收剂, 外围中加 0.2 毫升样品溶液, 并在外围上沿涂以水溶性胶, 然后左手持玻片(比外圈稍大), 右手加入 40% 氢氧化钾 0.5 毫升于外围样品中, 立刻盖上玻片, 轻轻摆动, 使外围中的样品与氢氧化钾溶液混和, 平放桌上, 等待 2—3 小时即可测定。室温较低时 (5—10℃) 需要适当延长至 4—5 小时。待作用完毕后, 移开玻片, 此时中央碟中硼酸溶液呈绿色, 用 0.02N 的标准盐酸滴定至灰色略带微红, 所消耗的酸体积就可从容积表上查得。

计算

$$W_N = N_{\text{HCl}} \times V_{\text{HCl}} \times 14$$

式中, W_N 为含氮量(微克), N_{HCl} 为标准酸的当量浓度, V_{HCl} 为标准酸的体积(微升)。

以酰胺氮占总氮的百分数表示则为:

$$\frac{W_N \times T \times 10^{-6}}{V_s \times C \times N\%} \times 100$$

式中, T 为稀释倍数, 即等于总体积/取用体积; V_s 为取用蛋白质样品体积; C 为取用蛋白质样品浓度%; $N\%$ 为总氮量。

讨论

(1) 使用以前, 仪器的清洗工作是实验成败的关键。微量弥散皿应该先用肥皂洗刷, 再以水洗净后放入浓硫酸-重铬酸钾洗液浸 2—3 小时, 以水冲净, 然后放入稀氢氧化钠溶液中浸 10—20 分钟, 冲洗干净, 最后再用无氨蒸馏水冲洗 3 次, 置于专用烘箱中烘干。

(2) 酰胺氮的测定除了上述方法外, 尚有用 10N HCl 在 37℃ 水解, 或 5% HCl 在 100℃ 水解 2 小时, 或用 NaOH 水解等方法。经常用的是酸水解, 但也要注意酸水解过程中常常因苏氨酸及丝氨酸部分分解而引起酰胺氮偏高。然而, 在低温 37℃, 用浓 HCl 水解 220 小时对苏氨酸、丝氨酸、瓜氨酸的分解并不显著, 其由于分解而产生的氨不超过 0.1%。同时, 在这一条件下天冬酰胺的酰胺氮 99% 释放完全。所以一般均采用 37℃ 而水解时间较长, 采用 6N HCl 高温, 则水解时间缩短。

二、个别氨基酸的定量测定

(一) 赖氨酸的测定

这里介绍两种。一种为三硝基苯磺酸法, 适用于蛋白质中赖氨酸含量的测定; 另一种为茚三酮法, 适用于发酵液中赖氨酸含量的测定。

1. 三硝基苯磺酸法^[15]

原理

由于三硝基苯磺酸(TNBS)只与蛋白质中N末端的 α -氨基及赖氨酸残基的 ϵ -氨基起反应, 反应后生成的 TNP-蛋白质经部分酸水解后分别产生含有 α -TNP-氨基及 ϵ -TNP-氨基的小肽碎片。在酸性溶液中前者可用有机溶剂抽提除去, 而酸溶液中留下的 ϵ -TNP-氨基含量即可在 340nm 处定量测定, 此含量即相当于蛋白质中赖氨酸的含量。

赖氨酸的标准溶液应该用 ϵ -TNP-赖氨酸。在 ϵ -TNP-赖氨酸来源困难时, 由于不同种类的 TNP-氨基酸在 340nm 处的吸收值一致, 可以用其他氨基酸代替。

试剂

(1) 4% 碳酸氢钠溶液: 4 克 NaHCO_3 加蒸馏水至 100 毫升。

(2) 50% 三氯醋酸溶液和 5% 三氯醋酸溶液: 分别称取 50 克或 5 克三氯醋酸, 加蒸馏水定容至 100 毫升。

(3) 6N 和 1N 盐酸溶液。

(4) 0.1% 三硝基苯磺酸溶液: 0.1 克三硝基苯磺酸加蒸馏水至 100 毫升。贮存于棕色瓶中。

(5) ϵ -TNP-赖氨酸标准溶液或丙氨酸(或其他氨基酸)标准溶液: 配成 0.5mM 的水溶液。

ϵ -TNP-赖氨酸的制备 取 280 毫克 α -N-苄氧羰酰-赖氨酸(1 毫克分子)溶于 15 毫升 4%NaHCO₃, 加入 400 毫克三硝基苯磺酸, 于 40℃ 保温 2 小时。反应后用 2NHCl 调至 pH1—2, 即产生 α -N-苄氧羰酰-赖- ϵ -TNP 赖氨酸黄色沉淀。过滤后将沉淀溶于乙酸乙酯, 此有机溶液用 pH1 的水洗涤数次, 以除去未作用的 α -N-苄氧羰酰-赖氨酸。然后用固体无水硫酸钠干燥, 过滤后减压至小体积, 加过量石油醚使析出。此沉淀经真空干燥后溶于 6 毫升含 36% HBr 的冰醋酸溶液中, 在 30—40℃ 水浴上振荡半小时以脱去苄氧羰基。反应结束后减压浓缩至干, 加无水甲醇使溶, 再减压浓缩以除去 HBr 及冰醋酸。如此反复数次, 最后加乙醚使沉淀析出。产物再溶于少量 pH1—2 的水溶液, 然后用乙酸乙酯抽提 2—3 次以除去少量未去苄氧羰基的杂质, 水相再减压浓缩, 即得层析纯的黄色 ϵ -TNP-赖氨酸结晶, 熔点 196℃。

(6) 丙酮。

(7) 乙醚。

操作步骤

(1) 面粉蛋白质中赖氨酸含量的测定。

面粉用过量 20 倍的丙酮脱脂两次, 再用乙醚处理并干燥。

取脱脂面粉 0.2000 克于离心管, 加 2 毫升 4% NaHCO₃, 不断用玻棒搅拌抽提数小时, 离心后再用 2 毫升 4% NaHCO₃ 抽提三次, 合并抽提液。加 5 毫克左右固体三硝基苯磺酸, 于 40℃ 保温 2 小时。反应后用 50% 三氯醋酸酸化, 使三硝基苯-蛋白质(TNP-蛋白质)沉淀完全, 离心弃去上清液, 沉淀再用 5% 三氯醋酸洗涤五次, 丙酮洗涤五次, 干燥后得 TNP-蛋白质。在 TNP-蛋白质中加 6NHCl 2.5 毫升, 封口, 于 110℃ 水解 2 小时。启口后, 取水解液 2 毫升, 加蒸馏水 12 毫升, 用 8 毫升乙醚抽提 4—5 次, 然后水相在 60℃ 水浴中略保温以除去少量乙醚, 最后取其 3 毫升(做 2—3 份)加蒸馏水 1 毫升, 在 340nm 测得光密度(以水为空白对照)。

由标准曲线查得为 A 微克分子氨基, 每克脱脂面粉在碱可溶性蛋白质中的赖氨酸的含量应为:

$$A \times \frac{2.5}{2} \times \frac{12}{3} \times 0.2 \times 145.2 = \text{赖氨酸(毫克/克脱脂面粉)}$$

式中, 145.2 为赖氨酸分子量。

(任何蛋白质中赖氨酸含量的测定, 都可用上述操作步骤, 只需称取适量蛋白质, 并省略 NaHCO₃ 的抽提步骤。)

(2) 标准曲线的制作: 用下列任意一种。

ϵ -TNP-赖氨酸的标准曲线制作: 取 0.5mM ϵ -TNP-赖氨酸 0.1—0.8 毫升(相应于 0.05—0.4 微克分子氨基酸), 加 1 毫升 4% NaHCO₃, 1 毫升 1N HCl, 最后用蒸馏水补充至 4 毫升, 在 340nm 测定(以蒸馏水作空白对照)。

丙氨酸的标准曲线制作: 取 0.5mM 丙氨酸标准溶液 0.1—0.8 毫升(相应于 0.05—0.4

微克分子氨基酸), 补充加蒸馏水至 1 毫升, 再加 4% NaHCO_3 1 毫升, 0.1% TNBS 溶液 1 毫升, 于 40℃ 保温 2 小时, 加 1 毫升 1N HCl 混合后, 在 340nm 测定(以蒸馏水代替丙氨酸的试剂空白作对照)。

讨论

(1) 若蛋白质中 N-末端也是赖氨酸, 在用有机溶剂抽提时也将被除去, 因而实际所测得的赖氨酸含量将偏低。但由于蛋白质分子量很大, 即使谷物中某些蛋白质的 N-末端也是赖氨酸, 总的 ϵ -氨基远多于此 α -氨基, 因此影响不大。

(2) 当 TNP-蛋白质在 6N HCl 中水解时, 为了避免 TNP-基团本身的破坏, 水解时间不宜过长, 一般在 110℃ 2 小时即可。因为 ϵ -TNP 小肽在 340nm 处的光吸收值与游离 ϵ -TNP-赖氨酸的值大致相当, 酸水解就不必彻底。

(3) 本法也可测定纯蛋白质中 ϵ -氨基的含量。对于大分子蛋白质部分 ϵ -氨基埋于分子内部, 由于受到构型上的阻碍与 TNBS 反应有可能不完全, 因此应尽可能使蛋白质变性(在碱性条件下保温数小时), 使分子内部氨基充分暴露后再与 TNBS 反应。在此条件下, 巯基也将氧化成二硫键, 可以避免巯基的干扰。

2. 茚三酮法

原理

利用赖氨酸与茚三酮在 pH3 以下的专一显色反应, 在 475nm 的定量测定。适合于发酵液中赖氨酸含量的快速测定, 分析范围为 0.075—0.2 毫克/毫升赖氨酸。

试剂

(1) 茚三酮试剂: 茚三酮 1.25 克加乙二醇甲醚 94 毫升。

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.7 克加 0.1M 柠檬酸(用 HCl 调节至 pH1.3) 32 毫升。

上述两溶液混和后加蒸馏水到 250 毫升。

(2) 赖氨酸标准溶液: 配制成 0.2 毫克/毫升。

操作步骤

(1) 待测溶液(含赖氨酸约 0.075—0.2 毫克/毫升) 2 毫升, 加茚三酮试剂 4 毫升, 摇匀后, 沸水浴加热 20 分钟, 冷却后用 72 型分光光度计测定 475nm 处的光密度。

(2) 标准曲线的制作: 于试管中分别加入赖氨酸标准溶液(0.2 毫克/毫升) 0.75、1.0、1.25、1.5、1.75 及 2.0 毫升, 各补足蒸馏水至 2.0 毫升, 以下步骤同上。以赖氨酸浓度为横座标, $\text{O.D.}_{475\text{nm}}$ 为纵坐标绘制标准曲线。

讨论

标准曲线不通过原点, 在赖氨酸 0.75—0.2 毫克/毫升范围内有线性关系。

(二) 色氨酸的测定

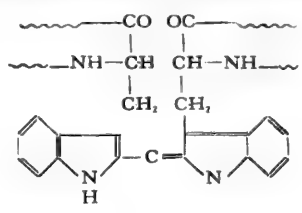
蛋白质的氨基酸组分分析中都使用酸水解法。但是色氨酸在酸性溶液中很容易受到

破坏,所以蛋白质的色氨酸含量必须另作分析,常用的方法是改用碱水解。我们这里介绍的两种方法是不必进行蛋白质水解的色氨酸直接测定法。

1. 对二甲基氨基苯甲醛法 (DAB 法)^[21]

原理

色氨酸能与对二甲基氨基苯甲醛试剂反应生成蓝色产物,它可能是:



其蓝色的深浅与色氨酸的量成线性关系,因此可以利用作为定量测定之用。操作简单。测定范围为色氨酸 10—100 微克。

试剂

- (1) 21.4N H₂SO₄: 148 毫升浓 H₂SO₄ 加水稀释至 250 毫升。
- (2) 对二甲基氨基苯甲醛溶液: 600 毫克对二甲基氨基苯甲醛溶于 180 毫升 21.4N H₂SO₄ 中,溶液浓度达到 15 毫克/4.5 毫升。
- (3) 1% NaNO₂: 500 毫克 NaNO₂ 加水至 50 毫升。
0.04% NaNO₂: 取 1% NaNO₂ 4 毫升,加水至 100 毫升。
- (4) 色氨酸标准液: 10 毫克色氨酸加少量蒸馏水,再加 1—2 滴 H₂SO₄ 使其完全溶解,稀释至 100 毫升,浓度达 100 微克/毫升。
- (5) 蛋白质样品液: 蛋白质样品浓度配制成色氨酸含量在 10—100 微克/毫升范围内。

操作步骤

(1) 按下表于试管中分别加入试剂

管号	标准曲线部分(毫升数)						样品部分(毫升数)
	1	2	3	4	5	6	7
色氨酸标准液	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	—
蛋白质样品	—	—	—	—	—	—	0.25
蒸馏水	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0.25
对二甲基氨基苯甲醛溶液	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5

- (2) 混匀,室温蔽光下放置 1.5 小时。
- (3) 各加 0.05 毫升 0.04% NaNO₂ 溶液,摇匀,放置 30 分钟。
- (4) 以第一管作为空白对照,于 72 型分光光度计中测定 600nm 处的光密度值 (OD₆₀₀)。
- (5) 绘制色氨酸准标曲线: 以色氨酸微克数为横坐标,OD₆₀₀ 为纵坐标作图。由样品

的 OD_{600} 值从标准曲线中查出相当的色氨酸微克数, 计算蛋白质中色氨酸的含量。

2. *N*-溴代琥珀酰亚胺滴定法 (NBS法)^[22]

试剂

- (1) pH 4 醋酸盐缓冲液 (0.05M, 含 8M 脲)。
- (2) 10mM *N*-溴代琥珀酰亚胺水溶液: 称取 4.4 毫克 *N*-溴代琥珀酰亚胺 (分子量 175.9) 加水至 2.5 毫升, 放置棕色瓶中, 新鲜配制。
- (3) 蛋白质样品液: 浓度配至色氨酸含量为 400 微克/毫升左右。

操作步骤

- (1) 于石英比色杯中加入蛋白质样品 0.2 毫升, pH4 醋酸盐缓冲液 2.8 毫升, 混匀。对照管加 pH4 醋酸盐缓冲液 3 毫升。
- (2) 于 751 型分光光度计中, 用微量进样器加入 *N*-溴代琥珀酰亚胺水溶液, 每次加 50 微升, 加毕混匀后读取 OD_{280} 值, 直至 OD_{280} 值下降至不变化为止。每次也同样在对照管中加 *N*-溴代琥珀酰亚胺水溶液。

按下表记录数据:

N-溴代琥珀酰亚胺(微升)	0	50	100	150	200	250	300
OD_{280}								

计算

$$\text{色氨酸 (mole/蛋白质 mole)} = \frac{\Delta OD_{280} \times 1.3 \times MW \times V}{W \times 5500} \quad \text{或}$$

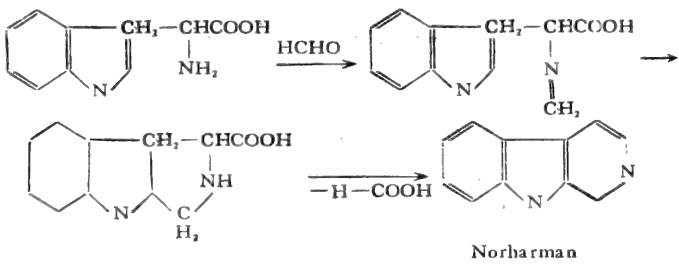
$$\text{色氨酸 (\%)} = \frac{\Delta OD_{280} \times 1.3 \times 186 \times V}{W \times 5500}$$

式中, ΔOD_{280} 为光密度测定的差值; W 为蛋白质毫克数; V 为反应系统终体积 (毫升); 5500 为色氨酸在 280nm 的克分子消光系数, 186 为色氨酸分子量; MW 为蛋白质分子量。

3. 荧光法^[17, 23]

原理

色氨酸与甲醛缩合成环状, 经三氯化铁氧化成去甲哈尔曼 (Norharman)。其反应式如下:



采用本法可测定 5—10 微升血清中游离色氨酸的含量。测定色氨酸含量可低达 0.1 毫微克分子 (nmol), 色氨酸含量在 0—10 毫微克分子范围内和相对荧光符合直线关系。

试剂 (以下试剂均用分析纯和玻璃器重蒸水配制)

(1) 0.6N 三氯醋酸溶液: 称取三氯醋酸 98 克, 溶于 1 升水, 临用前在冰箱内或冰水浴中冷却。

(2) 2% 甲醛溶液: 量取甲醛 (36—38%) 5.5 毫升, 加水至 100 毫升。

(3) 6mM 三氯化铁—0.6N 三氯醋酸溶液: 称取三氯化铁 162 毫克, 用 0.6N 三氯醋酸 100 毫升溶解。

(4) 标准色氨酸溶液:

(A) 1mM 贮存液: 精确称取色氨酸(分子量 204.23) 20.4 毫克, 溶于水, 加入氨水 (25—28%) 0.76 毫升, 加水至 100 毫升配成 1mM 色氨酸—0.1N 氢氧化铵溶液, 冰箱内贮存。

(B) 0.01mM 工作液: 精确吸取贮存液 1 毫升加水至 100 毫升。

操作步骤

(1) 血清的去蛋白处理:

精确吸取新鲜血清(如不立即分析宜放置—20℃ 冰箱保存) 50—100 微升, 和等体积 0.6N 三氯醋酸混匀, 静置 10 分钟后, 4000 转/分钟离心约 10 分钟, 吸取上清液用水精确稀释 5 倍, 即得稀释 10 倍的血清上清液。

(2) 分别吸取: (每组两份)

(A) 测定管: 稀释 10 倍的血清上清液 100 微升;

(B) 标准管: 0.01mM 色氨酸标准液 100 微升;

(C) 空白管: 水 100 微升;

分别于无塞的 12 × 150 毫米玻璃试管内(试管先用 3.5 毫升水银精确量出容积并用铜红扩散印泥划线烘烤标度)。

分别在各试管加入冰冷的 0.6N 三氯醋酸 2.5 毫升, 2% 甲醛 0.2 毫升及 6mM 三氯化铁—0.6N 三氯醋酸 0.1 毫升, 并立即置于煮沸的 8% 食盐水浴中, 试管内保持 $102 \pm 1^\circ\text{C}$, 历时 90 分钟(以上几个步骤应迅速进行, 不宜久置, 以防止色氨酸在操作过程中分解。保温过程水浴不可加盖以免蒸汽凝成水滴污染样品。应经常用沸水补充水浴内因蒸发散失的水份)。

保温毕取出冷却, 需加水至标度线然后测定荧光。激发光 304 毫微米, 发射光 448 毫微米。

计算

按下式计算血清中游离色氨酸含量。

$$\text{色氨酸(毫克分子/升)} = \frac{\text{测定管值} - \text{空白管值}}{\text{标准管值} - \text{空白管值}} \times 0.01 \times 10$$

讨论

(1) 在 102℃ 左右保温 90 分钟相对荧光值比 100℃ 高 8% 左右, 测定值也较稳定。保温时间在 90 分钟左右, 荧光值最大, 超过 180 分钟有下降趋势。

(2) 色氨酸在酸性条件下极易分解, 因此加三氯醋酸应在低温下进行, 并须尽快地加入甲醛, 后者对色氨酸有一定保护作用, 应在水浴前顷刻加入。保温完毕后所生成的荧光物质相当稳定, 室温下避光放置一个月仍然变化甚微。

(3) 本法不受血清中组氨酸、酪胺、苯丙氨酸等的干扰。5-羟色氨酸、吲哚醋酸等产生的荧光极微, 5-羟色胺不产生荧光, 色胺所产生的荧光为色氨酸的十分之一。

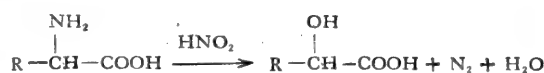
(三) 亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的联合测定^[24]

原理

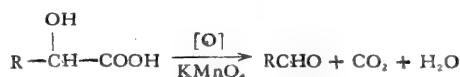
亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的联合化学测定是用高锰酸钾将脱氨的亮、缬两氨基酸氧化为丙酮, 蒸馏收集后, 以水杨酸测定两者的总量; 同时将异亮氨酸氧化为丁酮, 蒸馏收集后, 以香草醛测定。另外, 还用茚三酮将缬氨酸氧化的异丁醛, 以水杨醛单独测定。通过计算可以求得三种氨基酸的含量。

氧化反应包括以下几项基本反应:

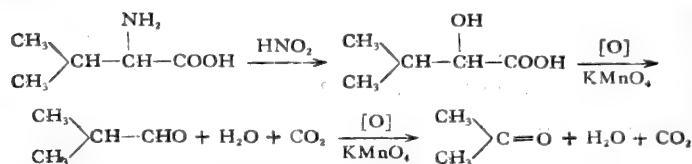
1. 氨基酸的脱氨



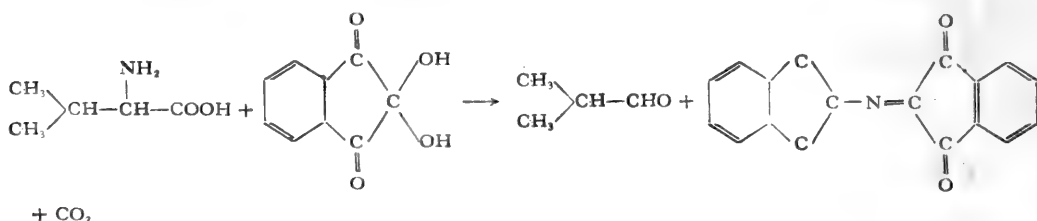
高锰酸钾氧化



例如: 缬氨酸



2. 茚三酮氧化 例如: 缬氨酸



试剂

(1) 4N 亚硝酸钠溶液(新鲜配制)。

- (2) 1M 硝酸钴溶液。
- (3) 2% 高锰酸钾溶液: 20 克高锰酸钾溶解于 pH6.8, 1M 的磷酸盐缓冲液中。
- (4) 11.3N 氢氧化钾溶液。
- (5) 12.8% (v/v) 水杨酸乙醇溶液(新鲜配制)。
- (6) 5% 香草醛溶液: 香草醛/甲醇/浓盐酸=1/2/18(W/v/v), (新鲜配制)。
- (7) pH5.5 磷酸盐缓冲液: K_3PO_4 2.8 克, KH_2PO_4 16 克, NaCl 3 克, 溶解于 800 毫升水中。
- (8) 固体茚三酮。
- (9) 10.3N 氢氧化钠溶液。

操作步骤

1. 蛋白质的酸水解 精确称取蛋白质样品 25 毫克, 加 5 毫升 8N 硫酸, 利用高压消毒锅在 15 磅加压水解 6—10 小时, 加水稀释至 10 毫升。

2. 高锰酸钾氧化 亮、缬氨酸含量之和及异亮氨酸含量的测定。

取蛋白质水解液 5 毫升, 加 4N 亚硝酸钠 1 毫升, 混合静置 10 分钟, 以沸水浴加热 10 分钟驱除过量的亚硝酸, 以氢氧化钠中和后稀释至 10 毫升。取此液 2 毫升, 置 50 毫升蒸馏瓶内, 加 1M 硝酸钴溶液 0.2 毫升, 2% (或 1%) 高锰酸钾溶液 5 毫升, 加水使总体积接近 10 毫升, 再加适量长约 1 厘米的玻璃纤维, 防止喷溢, 以微火在 10 分钟左右的时间蒸至将近全干。馏出液经水冷凝管冷却, 并以冰浴收集。用 0.5—1 毫升水洗涤冷凝管壁后稀释蒸出液至 10 毫升。

(1) 亮、缬氨酸总量的测定: 取蒸出液 1 毫升加水至 2 毫升, 再加 11.3N 氢氧化钾 2 毫升及 12.8% 水杨醛乙醇溶液 1 毫升, 混和后在 50℃ 保温 1 小时, 冷却后在 520nm 比色, 测得亮、缬氨酸氧化得丙酮的总光密度 (OD_{LV})。

(2) 异亮氨酸含量的测定: 取蒸出液 1 毫升和香草醛溶液 1 毫升, 比重 1.84 的硫酸 1 毫升, 混合后在 45℃ 保温 30 分钟, 冷却, 加水至 5 毫升, 立即在 610nm 比色, 测得异亮氨酸的光密度 (OD_I)。

3. 茚三酮氧化——缬氨酸含量的测定 取蛋白质水解液 4 毫升, 以氢氧化钠中和后用水稀释至 10 毫升。取此液 2 毫升加 pH5.5 磷酸盐缓冲液 6 毫升, 固体茚三酮 40 毫克, 加水使总体积接近 10 毫升, 用上述同样蒸馏方法以微火在 10 分钟左右的时间蒸干, 用冰浴收集蒸出的异丁醛液稀释至 10 毫升。以此液 3 毫升, 加 10.3N 氢氧化钠 2 毫升, 20% 水杨醛乙醇溶液 1 毫升, 混合后在 50℃ 保温 70 分钟, 冷却后在 500nm 比色, 则得缬氨酸的光密度 (OD_{VB})。

4. 标准曲线制作 三种氨基酸都从水解开始和样品平行处理, 同样按上述操作步骤进行测定。

三种氨基酸可分别称取 10 毫克, 加 10 毫升 8N 硫酸, 与样品相同条件下水解, 最后稀释至 20 毫升。

然后按(表 3.3)用量进行蒸馏和测定

绘制标准曲线时, 横坐标直接用氨基酸量表示, 所以实际应用无须考虑它们的氧化率如何。在横坐标上方添一表示含量百分率的横轴, 如果分析样品很多而取样量严格一致,

表 3.3 氨基酸用量表

高锰酸钾氧化			茚三酮氧化					
异亮氨酸(丁酮)			亮氨酸或缬氨酸(丙酮)			缬氨酸(异丁醛)		
用于氧化的溶液配制		相当于 5 毫升比色液中含量(微克)	用于氧化的溶液配制		相当于 5 毫升比色液中含量(微克)	用于氧化的溶液配制		相当于 5 毫升比色液中含量(微克)
水解液(毫升)	水(毫升)		水解液(毫升)	水(毫升)		水解液(毫升)	水(毫升)	
1.25	3.75	12.5	1.0	4.0	10	0.5	3.5	15
2.5	2.5	25.0	2.0	3.0	20	1.0	3.0	30
3.75	1.25	37.5	3.0	2.0	30	1.5	2.5	45
5.0	0	50.0	4.0	1.0	40	2.0	2.0	60

可直接读出各氨基酸的百分率[百分率坐标按 5 毫升比色液代表 250 微克样品(高锰酸钾氧化)及 6 毫升比色液代表 600 微克样品(茚三酮氧化)](见图 3.4)。

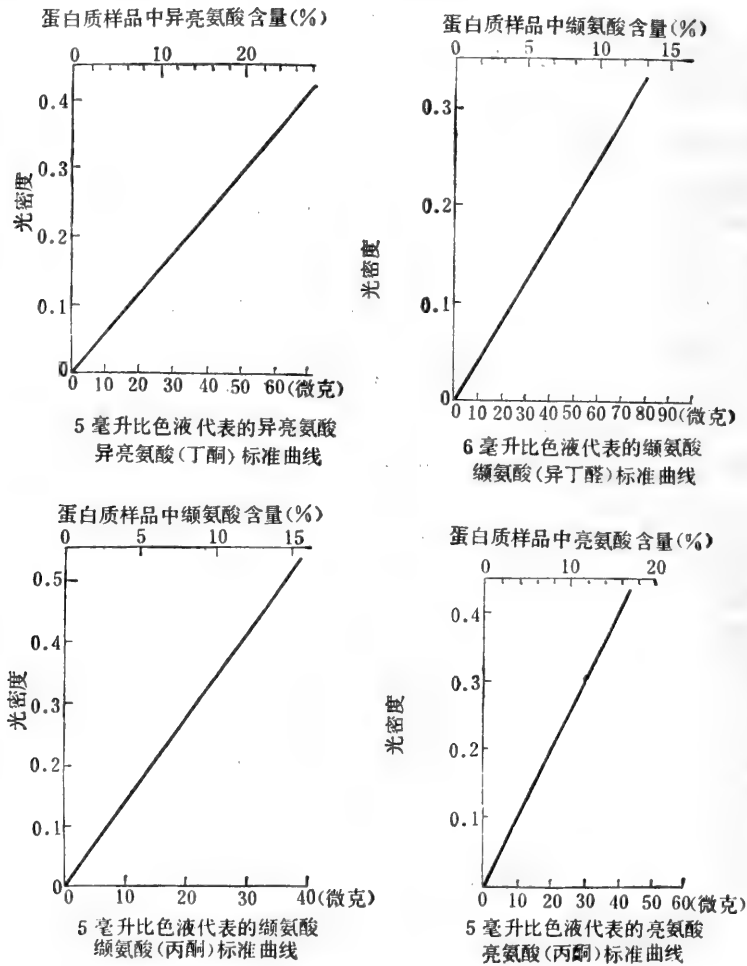


图 3.4 氨基酸的标准曲线绘制法(举例)

计算

(1) 根据 OD_i 从异亮氨酸(丁酮)标准曲线上读出异亮氨酸的含量百分率。

(2) 根据 OD_{VB} 从缬氨酸(异丁醛)标准曲线上方读出缬氨酸含量百分率。

(3) 按缬氨酸百分率在缬氨酸(丙酮)标准曲线上读出它的光密度 OD_{VA} 。

(4) 设亮氨酸的光密度为 OD_L , 则

$$OD_L = OD_{LV} - OD_{LA}$$

然后根据在亮氨酸(丙酮)标准曲线与读得亮氨酸含量的百分率。

讨论

要达到较好的重复性,蒸馏操作是关键的一步。蒸馏器的接头要磨口,保证不漏气,用冰浴收集,以免挥发损失。蒸馏时最重要的是掌握火候,火焰大小要恰到好处,让它在十分钟左右蒸干,既不太短,以免红色液喷溢过去(如果有一点喷溢过去,馏液不能用,冷凝器洗净后,方能作第二个样品),也不宜太慢,以免氧化不完全;在蒸到将近干时,要特别小心,要将火焰和瓶底距离拉大,最后一两滴,可以利用玻璃本身的余热,将它烤干,再用火焰很快地环绕圆底烘烤一下,使内含物干燥而不发烟。蒸完拆开,最好用 0.5—1 毫升水洗一下冷凝器壁,将洗液并入馏液。玻璃纤维加得适当,是克服喷溢的要点之一,不宜用其它东西代替。

(四) 苯丙氨酸的测定^[17, 25]

原理

苯丙氨酸与茚三酮及铜盐反应生成荧光复合物, L-亮氨酸-L-丙氨酸二肽能增强这一反应。荧光复合物的最高激发波长为 365nm, 最高发射波长为 490nm。采用本法可测定 5—10 微升血清中游离苯丙氨酸的含量。苯丙氨酸含量在 0—12 毫微克分子范围内和相对荧光值符合直线关系。

试剂 (以下试剂均用分析纯和玻璃器重蒸馏水配制)

1. 二肽-茚三酮试剂

(1) 5mM 亮丙二肽溶液: 称取 L-亮氨酸-L-丙氨酸量(分子量 202.25) 1 毫克溶于 1 毫升水,临用时配制;

(2) 30mM 茚三酮溶液: 称取茚三酮(分子量 178.15) 534 毫克溶于 100 毫升水,冰箱内贮存;

(3) 0.6M 琥珀酸盐缓冲液: 称取琥珀酸 7.086 克加水约 25 毫升,加入 4.8N 氢氧化钠(称取 9.6 克溶于 50 毫升水)约 22 毫升,调节至 pH5.88,加水至 100 毫升,冰箱内贮存。

临用前将 A、B、C 三种溶液按 1:2:5 容积比混合。

2. 铜试剂

(1) 25mM 碳酸钠-0.4mM 酒石酸钾钠溶液: 称取无水碳酸钠 2.66 克,酒石酸钾钠(含 4 份结晶水) 113 毫克加水至 1 升;

(2) 0.8M 硫酸铜溶液: 称取 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 100 克,溶于 500 毫升水。

临用前将 A、B 两种溶液按 3:2 容积比混匀。

3. 0.6N 三氯醋酸溶液 称取三氯醋酸 98 克溶于 1 升水。临用前取 0.6N 三氯醋

酸稀释 10 倍,得 0.06N。

4. 标准苯丙氨酸溶液

(1) 1mM 贮存液: 精确称取 L-苯丙氨酸(分子量 165.19) 16.5 毫克,溶于 100 毫升水,冰箱内贮存;

(2) 0.04mM 工作液: 吸取贮存液 2 毫升加水至 50 毫升。

操作步骤

1. 血清的去蛋白处理 精确吸取新鲜血清(如不立即分析宜放置-20℃冰箱保存) 50—100 微升,和等容积 0.6N 三氯醋酸混匀,静置 10 分钟后离心,4000 转/分钟约 10 分钟,吸取上清液用水精确稀释 5 倍,即得稀释 10 倍的血清上清液。

2. 分别吸取 (每组两份。)

(1) 测定管: 稀释 10 倍的血清上清液 100 微升;

(2) 标准管: 0.04mM 苯丙氨酸溶液 25 微升,加入 0.06N 三氯醋酸溶液 100 微升;

(3) 空白管: 0.06N 三氯醋酸溶液 100 微升;

于 10 或 20 毫升试管,用水补充容积至 200 微升。

在各试管内加入 0.3 毫升二肽-茚三酮试剂混匀。放在 75℃ 水浴中保温 80 分钟(或 65—70℃ 保温 140 分钟左右)。保温完毕将试管下半部浸于自来水中冷却,加入 2.5 毫升铜试剂,振荡混匀在 90 分钟内测定荧光。激发光 385 毫微米,发射光 472 毫微米。

计算

根据下式计算出血清中游离苯丙氨酸含量。

$$\text{苯丙氨酸(毫克分子/升)} = \frac{\text{测定管值} - \text{空白管值}}{\text{标准管值} - \text{空白管值}} \times 0.04 \times \frac{25}{100} \times 10$$

讨论

(1) 反应的温度、时间对荧光物质的生成有显著影响。60℃ 保温 120 分钟所得相对荧光值较低,苯丙氨酸含量略高时,测定值容易参差不齐,低于 60℃ 相对荧光值更低,实验更加不稳定。将温度提高至 65—70℃ 相对荧光值增高,保温约 140 分钟以后荧光值不再显著增高,此时的测定值约为 60℃ 保温 120 分钟时的两倍。将温度提高至 75℃、相对荧光最高值提前在 80 分钟左右出现,维持半小时左右后逐渐减退。80℃ 以上相对荧光值显著降低,最高值更早出现。

(2) 荧光物质的稳定性: 从保温完毕加入铜试剂后算起,相对荧光值约稳定 90 分钟,以后逐渐下降。

(3) 苯丙氨酸和茚三酮、铜盐作用的产物如果没有二肽存在几乎没有荧光产生。能促使产生荧光的二肽甚多,以 L-亮-L-丙二肽的荧光值为 100%,则甘-L-丙为 95%,甘-dL-苯丙为 75%,L-丙-L-丙为 70%,L-丙-甘为 30%,甘-L-色为 28%。这些二肽单独和茚三酮作用都不显荧光,在 pH5.8 时,除苯丙氨酸外,只有亮氨酸和精氨酸产生荧光,相当于等当量苯丙氨酸的 4%,除此以外其他氨基酸均小于 0.5%,可以认为对苯丙氨酸有较好的专一性。

(4) 反应溶液的 pH 低于 5.8, 产生的荧光较低, pH 大于 5.8 荧光增加, 在 pH6.8 时达到最高值, 但专一性下降。由于蛋白质沉淀剂三氯醋酸对 pH 有较大影响, 应该严格限制用量, 在实际操作中血清用量应限于 10 微升, 用量过大会使三氯醋酸用量也相应增多, 除非用适量氢氧化钠中和, 否则使荧光值降低甚至消失。

(五) 酪氨酸的测定^[17, 26]

原理

酪氨酸能和 1-亚硝基-2-萘酚反应成为有色化合物, 此化合物在硝酸和亚硝酸钠存在条件下加热, 可以产生稳定的荧光物质。它的最高激发波长为 470nm, 最高发射波长为 545nm。反应后的多余试剂用二氯乙烷除去。采用本法可测定 10 微升血清中游离酪氨酸的含量。酪氨酸含量在 0—10 毫微克分子范围内和相对荧光符合直线关系。

试剂 (以下试剂均用分析纯和玻璃器重蒸馏水配制)

1. 亚硝基苯酚试剂

(A) 1-亚硝基-2-萘酚乙醇溶液: 称取 1-亚硝基-2-萘酚(分子量 173.16) 200 毫克, 溶于 100 毫升无水乙醇。4℃ 保存。

(B) 3N 硝酸: 量取浓硝酸(65—68%) 20 毫升加水至 100 毫升。

(C) 0.1N 亚硝酸钠: 称取亚硝酸钠 690 毫克, 溶于 100 毫升水。4℃ 保存。

临用前顷刻将 A、B、C 三种溶液按 2:3:3 容积混合。

2. 0.6N 三氯醋酸溶液 称取三氯醋酸 98 克溶于 1 升水中。稀释 10 倍即得 0.06N。

3. 1,2-二氯乙烷 ($\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$)

4. 标准酪氨酸溶液

1mM 贮存液: 精确称取 L-酪氨酸 18.1 毫克, 先加入数滴浓盐酸, 微热待完全溶解后加水数十毫升, 用氢氧化钠中和至接近中性, 加水至 100 毫升。在冰箱内贮存。

0.04mM 工作液: 精确吸取贮存液 2 毫升, 加水至 50 毫升。

操作步骤

1. 血清的去蛋白处理 精确吸取新鲜血清(如不立即分析宜放置 20℃ 冰箱保存) 50—100 微升, 和等体积 0.6N 三氯醋酸混匀, 静置 10 分钟后离心, 4000 转/分钟约 10 分钟, 吸取上清液用水精确稀释 5 倍, 即得稀释 10 倍的血清上清液。

2. 分别吸取 (每组两份。)

(A) 测定管: 稀释 10 倍的血清上清液 100 微升;

(B) 标准管: 0.04mM 酪氨酸溶液 25 微升, 加入 0.06N 三氯醋酸溶液 100 微升;

(C) 空白管: 0.06N 三氯醋酸溶液 100 微升;

分别置于 15 毫升磨砂玻璃塞长管内, 用水补充容积至 200 微升。

将试管置于 55℃ 水浴数分钟, 加入新鲜配制的亚硝基萘酚试剂 0.3 毫升, 充分摇匀, 55℃ 保温 20 分钟。保温毕加入水 2.5 毫升, 充分摇匀后再加入二氯乙烷 3 毫升。再充分振摇以便将多余的试剂抽提入二氯乙烷中, 4000 转/分钟离心约 10 分钟, 将上层水溶液移置于另一试管内, 在 180 分钟内测定荧光。激发光 468 毫微米, 发射光 555 毫微米。

计算

根据下式计算出血清中游离酪氨酸含量。

$$\text{色氨酸(毫克分子/升)} = \frac{\text{测定管值} - \text{空白管值}}{\text{标准管值} - \text{空白管值}} \times 0.04 \times \frac{25}{100} \times 10$$

讨论

(1) 反应温度对相对荧光的关系: 以 55℃ 保温 20 分钟相对荧光达最高值以 100% 计, 35℃ 保温 20 分钟仅 20.3%, 且不稳定, 高于 55℃ 相对荧光值逐渐下降, 70℃ 保温 20 分钟降低至 75.1%。55℃ 不同保温时间, 以 20—40 分钟之间相对荧光值最高且较稳定, 少于 20 分钟或多于 40 分钟均明显下降。

(2) 荧光物质的稳定性: 从保温完毕算起, 相对荧光值在 180 分钟内平均减少 2% 左右。

(3) 酪氨酸荧光分光光度测定法也和比色法一样, 不能区别酪氨酸和酪胺, 但因组织中和血清中酪胺含量极微, 一般不造成困难。其他如色氨酸、苯丙氨酸、色胺、5-羟色氨酸、5-羟吲哚醋酸均有很轻微的荧光值。

(六) 脯氨酸的测定^[27]

原理

在丙酮溶剂中, 脯氨酸与吲哚醌(isatin)反应形成蓝色化合物, 能用以测定蛋白质水解液中的脯氨酸含量。在一定控制条件下(包括 pH, 缓冲液浓度和吲哚醌浓度), 可以在其他氨基酸存在下直接进行测定, 不受羟脯氨酸的干扰。

试剂

1. 柠檬酸盐缓冲液 (0.1M, pH3.9) 柠檬酸 2.1 克, 加 20 毫升 1N 氢氧化钠, 加蒸馏水至 100 毫升。pH 计检测(可用 0.1N 盐酸调)。

2. 0.075% 吲哚醌丙酮溶液 37.5 毫克吲哚醌溶解于 50 毫升丙酮中。置于棕色瓶, 贮存于冰箱, 退色失效。

3. 水饱和的酚溶液 于分液漏斗内加入酚及水, 剧烈摇动后, 放置过夜分层, 取下层酚溶液。

4. 6N 盐酸 取 12N 盐酸稀释一倍。

5. 脯氨酸标准溶液 用 0.25N 盐酸配制成 10 微克/毫升。

操作步骤

1. 蛋白质样品 称取蛋白质样品(例如白明胶)5 毫克(含脯氨酸量较少的蛋白质可适当增加称量), 加 2 毫升 6N 盐酸, 封管后 140℃ 水解 4 小时。启封, 加蒸馏水稀释至盐酸浓度达 0.25N。取一定量蛋白质酸水解液(0.1—0.5 毫升范围内, 含脯氨酸 0.5—5 微克)于 5 毫升小烧杯内, 75℃ 干燥数小时(注意必须达到完全干燥)。残留物加 0.2 毫升 pH3.9 柠檬酸缓冲液, 使残留物完全溶解后, 加 0.25 毫升 0.075% 吲哚醌丙酮溶液, 混匀, 于 100℃

烘箱内使溶液蒸发(约半小时左右)。以下各步在避光条件下操作。先加0.5毫升水饱和的酚溶液,剧摇后,加1毫升蒸馏水和2毫升丙酮,混匀得一相溶液,立即于598nm比色测定。

2. 标准曲线的制作 脯氨酸标准溶液(10微克/毫升)0.1, 0.2, 0.3, 0.4及0.5毫升(相当含脯氨酸1—5微克),按上述样品测定同样步骤操作。试剂空白不加脯氨酸。

讨论

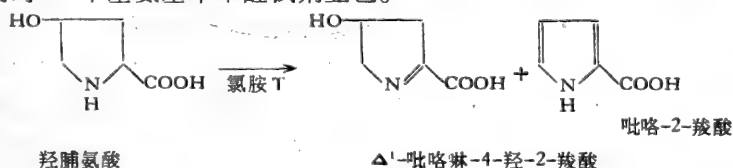
(1) 要获得最佳的灵敏度和专一性,必须严格控制本实验所规定的条件,即控制缓冲液0.1M, pH3.9, 吡啶酮浓度0.075%。pH偏低,使脯氨酸测定值下降;pH偏高,会出现其他物质的干扰。盐浓度增加,使脯氨酸测定值下降。

(2) 脯氨酸与吡啶酮形成的蓝色化合物见光不稳定,在一般实验室光照条件下,1小时后,光密度值下降26%,必须避光操作。

(七) 羟脯氨酸的测定

原理

羟脯氨酸在有过量丙氨酸(其作用是减少其他氨基酸的干扰)的条件下,用氯胺T氧化生成 Δ^1 -吡咯啉-4-羟-2-羧酸和吡咯-2-羧酸,它们不溶于甲苯中,但将溶液加热处理后可溶于甲苯中。所以在加热前先用甲苯除去其他物质,加热后再用甲苯把这些氧化产物抽提,最后用对-二甲基氨基苯甲醛试剂显色。



试剂

1. 0.2M 氯胺T试剂 称取氯胺T 1.41克,溶于不含过氧化物的甲基溶纤剂(methyl cellosolve) 25毫升中。新鲜配制。如有大量泡沫表示溶剂不纯。

2. 3.6M 硫代硫酸钠溶液 称取硫代硫酸钠(含五份结晶水) 89.3克,用水100毫升溶解。加甲苯一层保存。

3. 对-二甲基氨基苯甲醛试剂 量取浓硫酸 27.4毫升,慢慢加入无水乙醇 200毫升中,冷却,为溶液A。另称取对-二甲基氨基苯甲醛 120克,溶于无水乙醇中,用37℃水浴加热使溶解,冷却,为溶液B。在冰浴中,将溶液A慢慢加入溶液B中,并混匀。

4. 12N 氢氧化钾 称取氢氧化钾 67.2克,用蒸馏水溶解并稀释至100毫升。10N 氢氧化钾: 称取氢氧化钾 56.1克,用蒸馏水溶解并稀释至100毫升。1N 氢氧化钾: 用蒸馏水将10N 氢氧化钾稀释。0.1N 氢氧化钾: 用蒸馏水将1N 氢氧化钾稀释。0.05N 氢氧化钾: 用蒸馏水将0.1N 氢氧化钾稀释。

5. 6N 盐酸 浓盐酸 50毫升加蒸馏水稀释至100毫升。1N 盐酸: 用蒸馏水将6N 盐酸稀释。0.05N 盐酸: 用蒸馏水将1N 盐酸稀释。

6. 10% 丙氨酸溶液 称取丙氨酸 10克,溶于蒸馏水 90毫升中,调节至pH8.7,再

稀释至 100 毫升。

7. pH8.7 硼酸钾缓冲液 称取硼酸 61.8 克及氯化钾 225 克,溶于蒸馏水 800 毫升中,用 10N 氢氧化钾及 1N 氢氧化钾调节 pH 至 8.7,用蒸馏水稀释至 1 升。

8. 1% 酚酞乙醇溶液

9. 羟脯氨酸标准液 精确称取羟脯氨酸 18 毫克,加浓盐酸 0.2 毫升使溶解,移入 50 毫升容量瓶中,加蒸馏水至刻度。浓度为 0.36 毫克/毫升。新鲜配制。用时再用蒸馏水稀释 10 倍,浓度为 0.036 毫克/毫升。

操作步骤

以尿中羟脯氨酸为例:

1. 酸水解 由于尿中的羟脯氨酸大多数以结合形式,甚至大分子的结合形式存在,因此测定羟脯氨酸总量时应先行水解。分别吸取:

(A) 测定管: 样品液(尿液) 1.0 毫升;

(B) 标准管: 0.036 毫克/毫升羟脯氨酸 1.0 毫升;

(C) 空白管: 蒸馏水 1.0 毫升;

置于刻有 15 毫升刻度的有塞试管中。然后各加入浓盐酸 1.0 毫升,加塞后混匀,置 100℃ 烘箱中过夜(16—18 小时)。取出冷却后各加 1% 酚酞乙醇液 1 滴,并各加 12N 氢氧化钾 0.95 毫升,1N 氢氧化钾 0.5 毫升,并用 0.1N 氢氧化钾滴至粉红色。各管加蒸馏水至 15 毫升刻度。(测定管如有沉淀物,离心除去。)

2. 氧化和抽提 上述三管各吸取 3.0 毫升,分别加入相应的另外三只具塞试管中。分别各加蒸馏水 1.0 毫升,1% 酚酞乙醇液 1 滴,用 0.05N 氢氧化钾或 0.05N 盐酸调节至粉红色。各管加固体氯化钾 3 克使溶液饱和,再加 10% 丙氨酸 0.5 毫升及 pH8.7 硼酸钾缓冲液 1.0 毫升,混匀,室温放置 20—30 分钟,振摇数次。各加 0.2M 氯胺 T 试剂 1.0 毫升,混匀,室温放置准确 25 分钟(振摇数次)。各加入 3.6M 硫代硫酸钠溶液 3.0 毫升(中止氧化)及甲苯 5.0 毫升,塞紧,用力振摇 5 分钟,离心,吸出上层甲苯,弃去。再塞紧,置 100℃ 沸水浴中 30 分钟,用水冷却。各加甲苯 5.0 毫升,塞紧,用力振摇 5 分钟,离心。

3. 显色 吸取上述三管的上层甲苯抽提液 2.5 毫升,各加对-二甲基氨基苯甲醛试剂 1.0 毫升,充分混和,放置 30 分钟。以甲苯校正光密度到零,在 560nm 读取各管光密度值。

计算

按下式进行计算:

$$\text{羟脯氨酸(毫克/毫升)} = \frac{\text{测定管值} - \text{空白管值}}{\text{标准管值} - \text{空白管值}} \times 0.036$$

讨论

(1) 本法对羟脯氨酸有特异性,其他氨基酸即使同时存在 10,000 倍也无干扰。

(2) 如测定游离羟脯氨酸可省去第一步酸水解操作。如游离羟脯氨酸浓度低,所用标准羟脯氨酸可再稀释 10 倍。

(八) 胱氨酸的测定

原理

用亚硫酸盐使胱氨酸还原为半胱氨酸和 S-半胱氨酸磺酸,其他含二硫键的物质也被还原。通过巯基被磷钨酸还原成钨蓝的反应测定半胱氨酸,从而定量出胱氨酸。非胱氨酸的巯基可在加磷钨酸前先加氯化汞与巯基结合。因反应 pH 为 5,其他还原物如尿酸、抗坏血酸也使磷钨酸还原,通过空白对照加以去除。

试剂

1. 亚硫酸钠试剂 称取亚硫酸钠 12.6 克及氢氧化钠 0.2 克,溶于蒸馏水至 100 毫升。冰箱保存。
2. 醋酸盐缓冲液 2M 醋酸钠溶液 100 毫升和 2M 醋酸缓冲液 20 毫升混合。
3. 0.1M 氯化汞溶液 称取氯化汞 2.7 克溶于蒸馏水 100 毫升中。
4. 磷钨酸试剂 称取不含钼的钨酸钠 40 克,溶于蒸馏水约 300 毫升中,加 85% 磷酸 32 毫升,回流煮沸 2 小时,冷至室温,加蒸馏水至 1 升。加入硫酸锂(含 1 份结晶水)32 克。冰箱保存。
5. 胱氨酸标准溶液(0.4 毫克/毫升) 称取胱氨酸 40 毫克,溶于 0.1N 盐酸 100 毫升中。冰箱保存。

操作步骤*

1. 在四支试管中分别吸取
 - (A) 测定管: 样品液 1.0 毫升(胱氨酸含量在 0.2 毫克/毫升左右);
 - (B) 样品空白管: 样品液 1.0 毫升;
 - (C) 标准管: 胱氨酸标准液(0.4 毫克/毫升) 0.5 毫升,蒸馏水 0.5 毫升;
 - (D) 试剂空白管: 蒸馏水 1.0 毫升。
2. 胱氨酸的还原反应 上述各管分别加入醋酸盐缓冲液 1.0 毫升,亚硫酸钠试剂 0.3 毫升。测定管和标准管各蒸馏水 1.7 毫升;样品空白管和试剂空白管各蒸馏水 1.5 毫升;0.1M 氯化汞溶液 0.2 毫升、混合后放置 2 分钟。
3. 巯基的还原反应和比色 上述各管分别加磷钨酸试剂 1.0 毫升,混和后 15 分钟内,用 600nm 比色。以试剂空白管校正光密度到 0 点,读取标准管光密度读数;以样品空白管校正光密度到 0 点,读取测定管光密度读数。

计算

按下式计算:

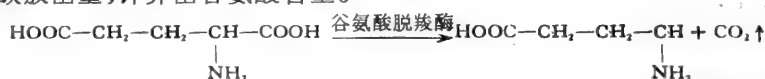
$$\text{胱氨酸(毫克/毫升)} = \frac{\text{测定管光密度}}{\text{标准管光密度}} \times 0.2$$

* 本操作步骤可用于测定尿液中胱氨酸含量。如果尿液沉淀用显微镜检查有胱氨酸结晶时,将尿液 10 毫升离心,倒出上清液。沉淀物加 1N 盐酸 1.0 毫升后放 60℃ 恒温水浴锅中保温 15 分钟,使胱氨酸溶解。再离心后取此上清液与尿液初次离心的上清液合并进行分析。如沉淀检查无胱氨酸结晶,此步可省去。

(九) 谷氨酸的测定^[28]

原理

L-谷氨酸在大肠杆菌的谷氨酸脱羧酶作用下脱羧放出二氧化碳,由测压法(附录)测得二氧化碳放出量,计算出谷氨酸含量。



试剂

1. 大肠杆菌丙酮粉的制备 大肠杆菌于 37℃ 液体培养 18 小时(培养基成份:豆饼水解液 3%, 蛋白胨 1%, 酵母膏 1%, 牛肉膏 1%, 玉米浆 0.5%, K_2HPO_4 0.25%, pH7.0), 离心(3500 转/分) 20 分钟, 收集菌体。菌体用冷蒸馏水或生理盐水洗涤 1—2 次, 离心后, 将菌体用冷丙酮(0℃ 以下)搅匀, 抽滤, 滤瓶再用冷丙酮洗涤, 反复几次, 得粉白色的大肠杆菌丙酮粉, 具有专一性强的谷氨酸脱羧酶的活性。丙酮粉置干燥器内冰箱贮藏, 可保持数月酶活性不变。

2. 0.5M pH4.8 醋酸盐缓冲液 称取 68.04 克醋酸钠, 在蒸馏水中溶解后, 加醋酸调至 pH4.8, 最后定容至 1000 毫升。

3. 2% 大肠杆菌丙酮粉悬液(含谷氨酸脱羧酶) 称取 2 克丙酮粉溶于 100 毫升 0.5M, pH4.8 醋酸缓冲液中。

操作步骤

(1) 取适当稀释的样品液 1 毫升(谷氨酸含量不超过 0.5—1.0 毫克)于反应瓶主室(F)中, 其中再加 0.2 毫升 pH4.8 醋酸盐缓冲液, 1 毫升蒸馏水; 在反应瓶侧室(G)内加入 0.3 毫升大肠杆菌丙酮粉悬液。(见图 3.5)

(2) 装瓶密封, 固定在振荡板上放入 37℃ 恒温水浴。旋调检压液达 260 毫米左右, 振荡, 与外界平衡 5 分钟, 关闭上端三向阀门与外界隔闭, 旋检压液至 150 毫米处, 再振荡 5 分钟, 调准检压液闭口端至 150 毫米处, 记下开口端检压液高度, 此为初读。

(3) 记下初读后, 迅速将侧室中酶液倒入反应液中, 振摇 10—15 分钟(使二氧化碳完全放出)。旋调检压液闭口端至 150 毫米记下开口端检压液高度, 此读数减去初读再加上或减去空白瓶差额即为压差 ΔH 。

根据下式计算 L-谷氨酸含量:

$$\text{谷氨酸(毫克)} = K \times \Delta H \times \frac{147.130}{22,400,000}$$

式中, ΔH 表示在检压管上读出的压差毫升数,

147.130 为谷氨酸的分子量,

22,400,000 表示 1 克分子 L-谷氨酸脱羧标准状态下放出二氧化碳的微升数,

K 表示反应瓶常数(测定法见附录)。

讨论

本法专一性强, 不受其他氨基酸及 D-谷氨酸的干扰, 适用于谷氨酸生产中发酵液的

测定,测定量以不超过 1.0 毫克/毫升为宜。

附录 测压法简介

一、原理

在固定体积并保持一定温度的密闭系统中,气体的产生或消失可以从密闭在这系统中气体的压力的改变上测量出来,气体产生或消失的总量,可以利用气体定律计算求得。

测压法中目前最常用的为华氏微量呼吸计。它常用于研究有机体的呼吸作用和发酵作用,而且也研究其他有关 O_2 与 CO_2 气体交换反应。

二、仪器的构造

呼吸计的主要部分为玻璃制的反应瓶及其相连的压力计(图 3.5)。反应瓶为一带侧管(G)并在底部装有小玻璃杯(也有不装有小杯的)的玻璃瓶(F)。反应瓶与压力计(M)相连。压力计内装检压液*,压力计固定在金属板上,金属板插在振荡装置上,使反应瓶完全浸在恒温水槽中。在压力计底端套上一段橡皮管,橡皮管也充满检压液,并用玻棒塞住。压力计中液体的高度借螺旋(C)来调节,压力计的活塞(T)及反应瓶与压力计的连接处,都涂上一薄层羊毛脂,反应瓶用弹簧系于压力计上。这样当活塞关闭时整个系统就严密地封闭起来。

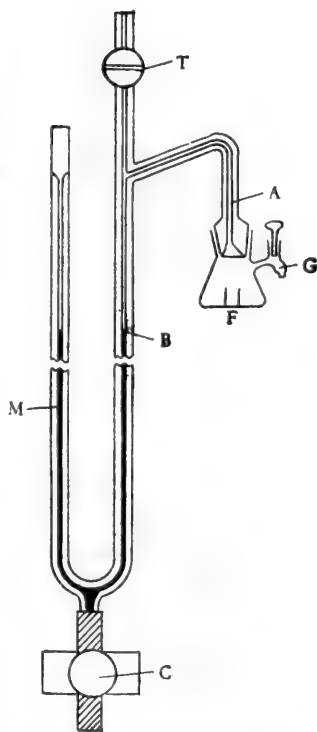


图 3.5 测压管简图

三、反应瓶常数的测定

测压计测定方法见正文中操作步骤所述。用测压计测气体体积变化时,测到的只是液柱变化(ΔH),如果知道液柱高度相当于被测气体的体积数(微升),那么就能求出反应前后气体体积变化。实际上通过测定反应瓶体积计算便可求出换算常数 K (微升/毫米),即为反应瓶常数。

反应瓶常数公式的推导:

若设 x = 反应前后某气体体积变化, h = 反应前后液柱高度的变化, K = 反应瓶常数。那么,此常数有下列关系: $x = h \times K$

常数 K 的推导——设反应是放气反应, x_1 和 x_2 分别为反应前后的体积。 $x = x_2 - x_1 = h \times K$

(1) x_1 ——反应前瓶内气体体积,应包括两部分 V_0 (气相的气体)和 V (溶解在液体内的气体),即 $x_1 = V_0 + V$ 。 V_0 为标准状态下气相气体体积,可将实验时压力 $P - p$ 和 T 换算到标准状态,根据气体方程式,可以得到:

$$\frac{(P - p)V_g}{T} = \frac{P_0 V_0}{273}, \quad V_0 = V_g \frac{273(P - p)}{T \times P_0}$$

式中, V_g 表示反应瓶气相体积(包括到测压管闭管的 150 毫米处); P 表示作用前气体混合物中某一气体的分压,计算对象为 CO_2 , 即为 CO_2 的分压; p 为气体混合液中水蒸汽压力,计算时需应用 $P - p$; P_0 表示标准大气压,即 760 毫米水银柱; T 为水浴温度,用绝对温度 ($273 + t^\circ C$) 表示。

V 为溶解在液体内的气体体积,应为 $V_1 \alpha$ (V_1 表示反应瓶液相的体积, α 表示气体在 760 毫米汞柱、温度 T 时的反应液溶解度)。

实际上溶解在液相内气体体积服从亨利定律,根据这个定律,当压力为 $P - p$ 时, $V = V_1 \alpha \frac{P - p}{P_0}$ 那么,

$$x_1 = V_0 + V = V_g \frac{273(P - p)}{T \times P_0} + V_1 \alpha \frac{P - p}{P_0}$$

(2) x_2 ——反应后,瓶内气体体积。

反应后气体体积变化从测压管压差计算,如压力变化为 h_{mm} , 设为放气反应,瓶内压力增加,为 $(P' - p + h)$,

* 检压液的配制——称取脱氧胆酸钠 5 克,氯化钠 23 克,分别溶解后合并,加水至 500 毫升。加少量伊文思蓝(准确量是每公斤加伊文思蓝 200 毫克)。再加几滴麝香草酚乙醇溶液防腐。此液比重为 1.033,液柱高 10⁴ 毫米时的压力等于 1 大气压。

那么

$$x_1 = V_g \frac{273(P-p+h)}{T \times P_0} + V_f \alpha \frac{(P-p+h)}{P_0}$$

(3) 求 x

$$\begin{aligned} x &= x_2 - x_1 = \left[V_g \frac{273(P-p+h)}{T \times P_0} + V_f \alpha \frac{(P-p+h)}{P_0} \right] - \left[V_g \frac{273(P-p)}{T \times P_0} + V_f \alpha \frac{(P-p)}{P_0} \right] \\ &= h \left[\frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_0} \right] \end{aligned}$$

在一定实验条件下, T 、 V_f 、 α 和 P_0 均为已知数, 只有 V_g 为未知数。但是如果测出反应瓶总体积减去 V_f (反应液体体积), 就可得到 V_g 值。这样对于每一个反应瓶来说, 上述都成为一定值, 若令常数

$$K = \frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_0}$$

则

$$x = h \left(\frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_0} \right) = h \times K$$

所以只要求出每一反应瓶的 K 值, 就可根据反应时测压管柱变化 (h) 求出气体的变化数 (微升)。

反应瓶总体积的测定

一般用洗净无杂质的水银分二段测定:

(1) 在连接反应瓶的磨口上方约 1 厘米处作一记号 A, 将反应瓶 F 灌满水银, 并驱除瓶中气体小心套上磨口, 使水银面正好到 A 处 (可以 G 塞调节); 然后取下倒出水银称重, 并测量水银温度。

(2) 将检压管安放在“万能支架”上 (也可用手操作), 使侧臂向下, 磨口朝上与水平成 30 度角左右, 从活塞 T 端处用一橡皮管接上, 皮管一端连接一漏斗, 将水银从漏斗注入, 旋转活塞 T, 使水银灌入检压管直至 B 点 (150 厘米刻度处) 和 A 处止。关闭活塞 T。将检压管中水银全部倒入预先称重的小烧杯内, 称重并测量温度。

水银清洗法——配制 5% 硝酸溶液 10 毫升, 分三次洗。在滤纸上戳一小孔, 放在三角漏斗中, 将水银缓缓倒入漏斗, 水银即成水珠状掉入硝酸中, 如此重复三次, 再用蒸馏水同样清洗三次, 最后用滤纸将水份吸干, 此水银即可用于标定。

举例

检压管内水银重 6.7 克, 反应瓶内水银重 218.34 克, 测定时水银温度 25°C, 这时水银密度 $d = 13.534$ 。

$$\text{总体积} = \frac{\text{检压管内水银重} + \text{反应瓶内水银重}}{\text{标定时温度下的水银密度}} = \frac{6.7 + 218.34}{13.534}$$

代入 K 常数公式

$$K = \frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_0}$$

V_g = 总体积 - V_f ; V_f = 瓶内反应液体体积 2.5 毫升;

α = CO_2 气体在 37°C 时在每毫升液体中的溶解度, 查表为 0.567

$$P_0 = \frac{\text{标准大气压下水银柱高} \times \text{标准状态下水银密度}}{\text{检压液的密度}} = \frac{760 \times 13.6}{1.033} = 10,000$$

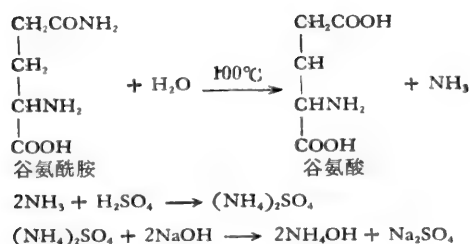
那么

$$K = \frac{(\text{总体积} - 2.5) \frac{273}{310} \times 1000 + 2.5 \times 0.567 \times 1000}{10,000} = 1.38585$$

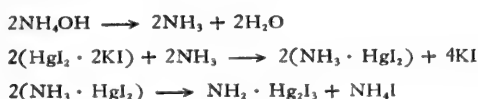
(十) 谷氨酰胺的测定

原理

谷氨酰胺用硫酸加热水解生成谷氨酸和氨。氨和硫酸结合成为硫酸铵, 与氢氧化钠反应而生成氢氧化铵, 再与纳氏 (Nessler) 试剂作用显棕黄色而比色测定。反应式如下:



氢氧化铵与纳氏试剂中的碘化钾汞钾盐 ($\text{HgI}_2 \cdot 2\text{KI}$) 作用,形成碘化双汞铵 ($\text{NH}_2 \cdot \text{Hg}_2\text{I}_3$):



试剂

1. 10% 硫酸溶液 (V/V)

2. 10% 氢氧化钠溶液

3. 2% 格替树胶溶液 将格替树胶(也称印度胶)2克用纱布包裹,浸于蒸馏水100毫升中过夜,然后将纱布内的胶汁挤入水内即得。

4. 纳氏试剂 贮存液——于500毫升三角烧瓶内加入碘化钾150克、碘110克、汞150克及蒸馏水100毫升。用力振荡7—15分钟,至碘色将转变时,此混合液即发生高热。随即将此烧瓶继续振荡,直至棕红色的碘变成带绿色的碘化钾汞为止。将上清液倾入2升容量瓶内,并用蒸馏水洗涤烧瓶内沉淀物数次,将洗涤液一并倾入,加蒸馏水至2升。应用液——在贮存液150毫升中加入10%氢氧化钠溶液700毫升及蒸馏水150毫升,混和即得(此试剂的酸碱度很重要,如与1N盐酸20毫升滴定时,则以需此试剂11—11.5毫升恰可使酚酞指示剂变成红色时最为适宜。否则必须校正)。

5. 谷氨酰胺标准液 (0.25 毫克/毫升) 精确称取谷氨酰胺25毫克,加蒸馏水至100毫升。当日配制。

操作步骤

1. 水解反应: 于三支试管中分别加入

(1) 测定管: 样品液0.50毫升;

(2) 标准管: 谷氨酰胺标准液(0.25毫克/毫升)0.50毫升;

(3) 空白管: 蒸馏水0.50毫升。

各管内加入10%硫酸溶液0.10毫升,混和,置沸水浴内10分钟,冷水内冷却。

2. 显色反应 上述各管分别加10%氢氧化钠0.15毫升,蒸馏水2.50毫升,混匀;加2%格替树胶液0.25毫升,混匀;最后加纳氏试剂1.00毫升混匀。用490nm进行比色,以空白管校正光密度至零点,读取测定管和标准管光密度读数。

计算

按下列公式计算:

$$\text{谷氨酰胺(毫克/毫升)} = \frac{\text{测定管光密度}}{\text{标准管光密度}} \times 0.25 \times 0.5 \times \frac{1}{0.5}$$

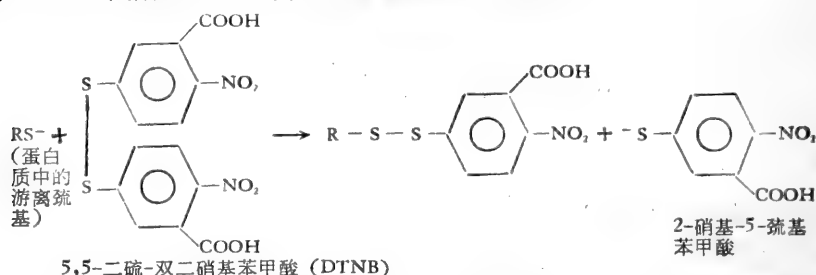
讨论

尿素在酸加热水解时也产生氨,对测定有影响。

(十一) 巯基的测定^[29]

原理

利用 Ellman 试剂测定蛋白质中的游离巯基。反应如下:



由 2-硝基-5-巯基-苯甲酸的生成量可以定量测定蛋白质中巯基的含量。已知 2-硝基-5-巯基-苯甲酸在 412nm 的克分子消光系数是 13,600。

试剂

1. 0.05M Tris-HCl 缓冲液, pH8.4 50 毫升 0.4M Tris 与 16.5 毫升 0.4M HCl 混合后,加蒸馏水至 200 毫升。

2. 0.01M DTNB 溶液 称取 5,5'-二硫-双二硝基苯甲酸 39.6 毫克,溶解于 0.05M 磷酸盐缓冲液 (pH7.0)。

3. 蛋白质样品溶液 蛋白质浓度配至巯基含量在 0.05—2.5 μmole 范围内。

操作步骤

(1) 于试管内加入蛋白质样品溶液 0.5 毫升,再加 pH8.4 Tris-HCl 缓冲液 2.5 毫升,0.01M DTNB 溶液 0.025 毫升,混和。

(2) 空白管以 0.5 毫升蒸馏水取代蛋白质样品溶液,其他试剂加量相同。

(3) 以空白管作对照,于 412nm 读取光密度值。

计算

$$\text{巯基} (\mu\text{mole}) = \frac{\text{OD}_{412}}{0.5 \times 13.6}$$

如知蛋白质溶液的 μmole 数,就可求出蛋白质分子中的巯基(半胱氨酸残基)含量。

讨论

(1) 有时巯基埋在蛋白质内部不易正确测定,这时可在反应系统中加有 4M 脲,使蛋白质分子松散,巯基暴露。

(2) 本法也可用于蛋白质二硫键的测定,这时可用巯基乙酸或巯基乙醇将蛋白质中

的二硫键还原成巯基,然后用 Sephadex G-25 分离除去小分子的巯基乙酸(醇),蛋白质部分用 DTNB 进行测定巯基含量。

第三节 蛋白质的定量测定

一、克氏定氮法

(一) 总氮量的测定法^[30,31]

原理

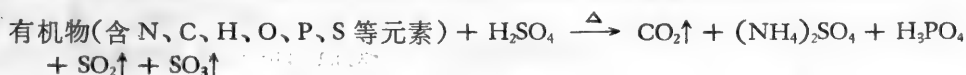
每一种蛋白质都有其恒定的含氮量。通过总氮量的测定求得蛋白质含量。

克氏(Kjeldahl)定氮法是食品工业、饲料分析、种子品质鉴定及生化研究测定含氮量经常使用较为精确的方法。

定氮法的基本原理是将蛋白质用浓硫酸分解,并使其中的氮变成铵盐状态,再与浓碱作用,放出的氨被酸吸收,滴定剩余的酸,算出含氮量。又从实验知道,各种蛋白质含氮量大多数在 16% 左右(14—18%),将含氮量乘以 6.25,即得蛋白质的量。微量克氏定氮法最低可测出 0.05 毫克氮,相当于 0.3 毫克左右蛋白质。

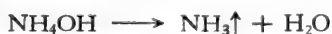
虽然定氮法有不少改良,基本原理和步骤还是一致的。

1. 消化 有机含氮物与浓硫酸混合加热消化,使前者全部分解,其中含有的碳氧化成二氧化碳逸散,所含的氮生成氨,并与硫酸化合形成硫酸铵残留于消化液中。

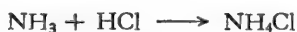


上述有机含氮物的分解反应进行很慢,消化要费很长时间,常加催化剂加速反应。硫酸铜是常用的催化剂,硫酸钾能提高硫酸的沸腾温度,两者常混合使用,起着加速氧化,促进有机物分解的作用。

2. 蒸馏 消化所得的硫酸铵与浓氢氧化钠作用,分解出氢氧化铵,然后用水蒸汽将氨蒸出,用酸液吸收。



3. 滴定 若用过量的标准盐酸吸收氨,则剩余未被中和的盐酸量可用标准氢氧化钠滴定,由所用盐酸克当量数减去滴定所耗之氢氧化钠克当量数,即被吸收的氨量。此称回滴法。



直接法可采用硼酸溶液作吸收液,氨被吸收后,指示剂颜色变化,再用强酸滴定,直至恢复至原来的氢离子浓度为止,用去强酸克当量数即相当于未知物中氨的克当量数。



试剂和仪器

1. 微量定氮仪器装置全套 包括蒸汽发生器、冷凝蒸汽收集器、微量定氮蒸馏瓶、小型冷凝管。

2. 消化炉
3. 浓硫酸
4. 过氧化氢 (30%)
5. 氢氧化钠溶液 (40%)
6. 催化剂 硫酸铜及硫酸钾按 2:8(w/w) 比例磨细充分混匀。
7. 标准 0.010N 盐酸和 0.010N 氢氧化钠溶液
8. 指示剂 0.1% 甲基红乙醇溶液。

操作步骤

1. 样品的消化(在通风橱中) 取适量固体或溶液样品(含氮量约在 1—2 毫克左右),置于微量克氏管(30 毫升)中,加 1—2 毫升浓硫酸及催化剂 50 毫克左右,在消化炉上倾斜放置,微火加热,这时瓶内物质碳化变黑,并产生泡沫,要特别注意控制火力,不能让黑色物质上升到颈部,否则将严重影响样品的测定结果。当混合液停止冒泡,气体逸出也较均匀时,可适当加大火焰使瓶内液体微微沸腾而不致跳荡。硫酸溶液逐步从棕黑色变成澄清。由于消化液澄清并不说明消化一定完成,为保证反应充分完成,继续沸腾 1 小时。或基本澄清后,将瓶取下,待稍稍冷却后,沿壁慢慢加入过氧化氢 2 滴,再继续加热十分钟,可反复几次。反应终了,溶液应呈淡蓝色或无色透明,若带有黄色表示消化未完全。如果蛋白质样品中含赖氨酸或组氨酸较多,则消化时间要延长 1—2 倍。消化完毕,静置使冷,仔细加入少量蒸馏水,洗涤管壁。每分析一样品,同样做三管,取平均值。又因实验室中空气往往含有极微量的氨,每次分析时都要另做空白对照,即一切处理与样品管相同,但不加蛋白质样品。

2. 氨的蒸汽蒸馏 氨的蒸汽蒸馏是在微量克氏定氮仪中进行。克氏定氮仪是由蒸

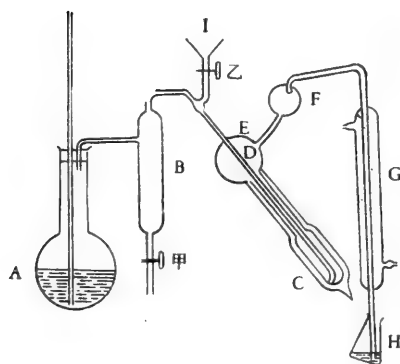


图 3.6 微量克氏定氮仪简图

汽发生、氨的蒸馏以及氨的吸收三部分组成。图中 A 是一个 1—2 升容积的烧瓶,其中盛蒸馏水(滴加硫酸,保持酸性,甲基红指示剂显示红色)作为发生蒸汽之用;B 是空管,冷凝的水及废液从此管底部排出;C 是蒸汽蒸馏部分,其中必有一细长管 D,一端与蒸汽发生部分联结,另一端直插 C 瓶底部, C 瓶上端有一出口 E,通过定氮球 F 及冷凝管 G,直接通于吸收瓶 H 中。仪器有甲、乙两个开关,样品及 40% 氢氧化钠都从开关乙的上部漏斗加入。消化后的样品就在此仪器中蒸馏、吸收,从而测定氮的含量。其操作步骤叙述如下:

先将 A 瓶中的水烧开,关闭甲、乙使蒸汽充分洗涤仪器,并检查仪器是否正常,约十五分钟左右,即可停止加热,切断蒸汽发生, C 瓶中的水液就回吸到 B 管中,开启开关甲,废液即从 B 管底部排出。将样品加于漏斗 I,开启开关乙,样品即从 D 管流入蒸馏瓶 C 中,以少量水洗涤克氏管 1—2 次,洗涤液一并加入 C 中,少量水洗涤漏斗,然后,将冷凝管 G 的出口及吸收瓶 H 中含 25 毫升 0.010N 盐酸标准液接触。标准酸液中滴加 2 滴甲基红指示剂,此时溶液呈红色。再于漏斗 I 中加入 5—10 毫升(与消化时加浓硫酸量 1—2 毫升相对应)

40% 氢氧化钠溶液,开启开关乙,使碱液流入 C,待刚流完而还剩余一点的时候,就立刻关闭乙,并于漏斗 I 中加入少量水封之。立刻加热,待蒸汽发生时,再关闭开关甲,此时蒸汽即从 D 管通入 C 瓶,约 5—10 分钟,或蒸馏瓶上部圆球烫手时开始计算时间,蒸馏 3 分钟,可以认为蒸馏完全。将 H 瓶下降,使冷凝管口离开液面,继续蒸馏 1 分钟,并用洗瓶吹入蒸馏水洗涤冷凝管口外壁。试验完毕,将漏斗中残留液全部洗净,停止加热,隔绝蒸汽发生器,废液即会倒吸入 B 管而排出,即可继续进行下一只样品测定。

使用克氏定氮仪时,开关甲、乙的掌握与实验成败很有关系,在加样时,开关甲一定要开启着,而且一定要使蒸汽发生后才能关闭,否则会发生样品倒吸现象。开关乙也要关闭及时,防止氨逸出。

3. 氮的滴定 于 H 瓶滴加指示剂 2 滴,用标准氢氧化钠溶液(约 0.010N) 滴定剩余的酸液,待红色变为黄色表示已达终点,记录所用体积,依下式求算含氮量。

$$\frac{(B - A) \times N_{\text{NaOH}} \times 14.008}{V} = \text{每毫升(或克)样品中含氮毫克数}$$

式中, A = 滴定样品用去的氢氧化钠毫升数;

B = 滴定空白用去的氢氧化钠毫升数;

N_{NaOH} = 氢氧化钠的当量浓度;

V = 所取样品的毫升数(或克数);

14.008 = 氮的原子量。

讨论

(1) 加速消化的催化剂种类很多。 K_2SO_4 与 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 混合物的比例,除 4:1 外,还有 3:1, 6:1 或 10:1。也可用 80 克 K_2SO_4 , 20 克 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 与 0.3 克 SeO_2 或 0.34 克 Na_2SeO_4 的混合物。有时样品中赖氨酸和组氨酸含量较多,为了缩短消化时间,在上述催化剂中再加少量 HgCl_2 (约 0.032 克/克催化剂),则赖氨酸中的氮在 4—5 小时可消化完全,组氨酸需 8 小时才消化完全。

(2) 氨气蒸馏时,为了使所有硫酸铵分解为氨,必须加入足量 40% 氢氧化钠,加入时应缓慢,以免产生剧烈反应而导致瓶内酸液倒吸和氨的损失,碱加入后,有铜氨离子、氢氧化铜或氧化铜等化合物生成,溶液呈蓝色或褐色。并有胶状沉淀产生,这是正常现象,反之,如果颜色不变,说明碱液可能不够。

(3) 亦可用混合指示剂,由 50 毫升 0.1% 甲基蓝乙醇溶液与 200 毫升 0.1% 甲基红乙醇溶液混合配成,贮于棕色瓶中。此指示剂在酸性范围是紫红色的,碱性范围呈绿色,变色范围狭 (pH5.4),很灵敏。

(4) 若用标准酸直接滴定,可用 2% 硼酸溶液 5 毫升及 2—3 滴混合指示剂,吸收蒸发的氨气,由紫色变为绿色,再以标准酸液 (0.010N) 直接滴定,由绿色变淡紫色为终点,记录所用体积,依下式计算:

$$\frac{(A - B) \times N_{\text{HCl}} \times 14.008}{V} = \text{每毫升(或克)样品中含氮毫克数}$$

式中符号代表意义同前述。

(5) 如果测定的不是纯蛋白质,可能含有非蛋白氮,要进行比较准确的测定,必须分

别测定蛋白氮和非蛋白氮。非蛋白氮的测定可以将样品制成均浆或抽提液，用三氯醋酸等沉淀剂将蛋白质沉淀出来，按总氮法测定上清液的含氮量，便得到非蛋白氮。

$$(\text{总氮量} - \text{非蛋白氮量}) \times 6.25 = \text{蛋白质含量。}$$

(二) 微量克氏定氮-茚三酮法^[35]

原理

蛋白质经消化后，有机氮呈 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 状态存在，用茚三酮法比色测定含氮量，以蛋白质中平均含量 16% 计算，即乘以 6.25 即可求出蛋白质的含量。

试剂

1. 10N H_2SO_4 溶液 取浓 H_2SO_4 8.3 毫升，加入到 21.7 毫升蒸馏水中。

2. 50% 醋酸溶液

3. 30% H_2O_2 溶液

4. 4M 醋酸盐缓冲液，pH5.5 4M 醋酸钠溶液与 4M 醋酸溶液按 443:57.5 的比例混和。

5. 茚三酮试剂 2 克茚三酮溶解于 50 毫升乙二醇甲醚，25 毫升 4.0M 醋酸盐缓冲液 (pH5.5)，25 毫升蒸馏水，再加 0.08 克 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。(检查 pH 必须达到 5.5)

6. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 标准溶液 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (A.R.) 烘至恒重。精确称取 50 毫克，加水定容至 100 毫升，得浓度为 0.5 毫克/毫升。用时稀释 10 倍，得 50 微克/毫升。

7. 蛋白质样品溶液 浓度 0.2—1.0 毫克/毫升范围内。

操作步骤

1. 样品的消化 蛋白质样品液 0.4 毫升置于微量克氏定氮消化瓶中，加 0.5 毫升 10N H_2SO_4 进行消化约半小时后，稍冷却滴加 30% H_2O_2 数滴，继续消化至溶液透明。冷却后加蒸馏水 4.8 毫升(总体积按 5 毫升计)。

2. 茚三酮反应 取上述消化液 0.2 毫升及 0.4 毫升于试管中，分别加 pH5.5 醋酸盐缓冲液至 2.0 毫升(空白管加 2.0 毫升同样缓冲液)。加茚三酮试剂 2 毫升，混匀，沸水浴中煮沸 30 分钟，冷却后加 50% 乙醇 6 毫升。于 570 毫微米读取光密度。

3. 标准曲线制作 在试剂中分别加 50 微克/毫升 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 液 0、0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 毫升，分别加 pH5.5 醋酸盐缓冲液至 2 毫升，按上述第二步同样步骤加入茚三酮试剂等，于 570 毫微米读取光密度。

数据处理

(1) 绘制标准曲线：以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 相当的微克氮量为横座标， OD_{570} 为纵座标作图。

(2) 由样品 OD_{570} 值从标准曲线上查出相当 μgN 含量，

$$\text{蛋白质(微克/毫升)} = \frac{N \text{ 含量} \times 6.25 \times 5}{V \times 0.4}$$

式中：V 为用作茚三酮反应的消化液毫升数。三肽以上和蛋白质都有此颜色反应。

二、福林-酚试剂法

福林-酚试剂法是测定蛋白质浓度应用最广泛的一种方法。

福林-酚试剂 (Folin-phenol reagent) 的显色原理包括两步反应: 第一步是在碱性条件下, 蛋白质与铜作用生成蛋白质-铜复合物; 第二步是蛋白质-铜复合物还原磷钼酸-磷钨酸试剂, 生成蓝色物质。在一定条件下, 蓝色强度与蛋白质量成正比例。

福林-酚试剂法最早由 Lowry 确定了蛋白质浓度测定的基本步骤, 以后在生化工作领域里广泛应用, 显现了本法的优越性, 同时, 也不断发现本法的专一性较差, 干扰物质较多, 因此, 修改的方法不断涌现。这里在介绍 Lowry 基本法的基础上, 再介绍两种修改法: (1) 有干扰物质存在下的测定; (2) 快速简易法。

本法的优点是操作简便, 灵敏度高。缺点是有蛋白质特异性的影响, 即不同蛋白质的显色强度稍有不同; 标准曲线也不是严格的直线形式。

本法的可测定范围是每毫升 25—250 微克蛋白质。

(一) Lowry 基本法^[32]

试剂

1. 试剂甲 (A) 10 克碳酸钠, 2 克氢氧化钠和 0.25 克酒石酸钾钠(或其钾盐或钠盐)溶解于 500 毫升蒸馏水中。(B) 0.5 克硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶解于 100 毫升蒸馏水中。每次使用前将 (A) 50 份与 (B) 1 份混和, 即为试剂甲。

2. 试剂乙 在 1.5 升容积的磨口回流瓶中加入 100 克钨酸钠($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 克钼酸钠 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 及 700 毫升蒸馏水, 再加 50 毫升 85% 磷酸, 100 毫升浓盐酸充分混和, 接上回流冷凝管以小火回流 10 小时。回流结束后, 加入 150 克硫酸锂, 50 毫升蒸馏水及数滴液体溴, 开口继续沸腾 15 分钟以便驱除过量的溴, 冷却后溶液呈黄色, (如仍呈绿色, 须再重复滴加液体溴的步骤) 稀释至 1 升, 过滤, 滤液置于棕色试剂瓶中保存。使用时用标准氢氧化钠滴定, 以酚酞为指示剂, 然后适当稀释(约加水 1 倍)使最终的酸浓度为 1N。

3. 标准蛋白质溶液 结晶牛血清白蛋白溶解于蒸馏水, 浓度 250 微克/毫升。

操作步骤

(1) 1 毫升待测样品溶液(适当稀释至约含 25—250 微克蛋白质), 加 5 毫升试剂甲混合, 室温下放置 10 分钟后加 0.5 毫升试剂乙, 立即混和均匀! (这一步混和速度要快, 否则会使显色程度减弱), 30 分钟后, 以不含蛋白质的试剂空白对照比色。72 型分光光度计可选用波长 650nm 或 660nm。若蛋白质的浓度在 20—100 微克, 也可选用 750nm; 125 微克以上则采用 500nm。在 660nm 所读取的光密度为 750nm 时的 90%。

(2) 标准曲线制作: 在各试管中分别加牛血清白蛋白溶液(250 微克/毫升) 0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 毫升, 并分别和蒸馏水补充到 1 毫升(即各管中分别含蛋白质量 0、50、100、150、200 和 250 微克)。以后加试剂及比色等操作步骤与样品操作相同。

讨论

(1) 在 Lowry 原始文献中试剂甲的配制方法如下: (A) 20 克碳酸钠溶解于 0.1N 氢氧化钠 1000 毫升中; (B) 0.5 克硫酸铜溶解于 1% 酒石酸钾钠中。同样在使用前将 (A) (B) 以 50:1 混和。由于其中的试剂 (B) 放置后会出现沉淀物, 且不易重新溶解, 所以这里作了更改, 即将酒石酸钾钠按原比例配制在 (A) 中。

另外, 也可以用柠檬酸三钠代替酒石酸盐, 即在上述配方中以 1% 柠檬酸三钠代替 1% 酒石酸盐, 这样, 试剂 (B) 放置数月也不会产生沉淀物。

(2) 某些难溶解于 0.1N 氢氧化钠的蛋白质沉淀(例用高氯酸或三氯醋酸沉淀的蛋白质)可采用以下步骤测定: 25—500 微克的细颗粒蛋白质沉淀中加入 1 毫升 1N 氢氧化钠, 约半小时或再多一些时间就会溶解, 然后加入 5 毫升试剂甲(其中不含氢氧化钠), 10 分钟后再加入 0.5 毫升试剂乙, 测定如前。如果在上述条件下, 蛋白质沉淀仍不溶解, 则须在 100℃ 加热 10 分钟, 促进溶解, 再行测定。

(3) 浓度较低的下列物质对显色没有影响: 尿素(0.5% 左右)、胍(0.5% 左右)、硫酸钠(1%)、硝酸钠(1%)、三氯醋酸(0.5%, 中性)、乙醇(5%)、乙醚(5%)、丙酮(0.5%), 但这些物质浓度高时必须做校正曲线。若样品酸度较高, 显色后色浅, 则必须提高碳酸钠-氢氧化钠溶液的浓度 1—2 倍。样品中含酚类、柠檬酸、糖类和甘油等都有干扰作用。

(二) 在有干扰物质存在下的改良测定法^[33]

下列物质有干扰作用: 酚类(除硝基酚)、甘氨酸(0.5% 以上)、胍(0.005% 以上)、硫酸铵(0.15% 以上)、二硫丁四醇、2-巯基乙醇、谷胱甘肽、钾离子(12mM 以上)、乙二胺四乙酸、青霉素、三羟甲基氨基甲烷、N-二(羟乙基)甘氨酸、乙酰丙酮、蔗糖、氨基葡萄糖、果糖、甘露糖、鼠李糖、木糖、山梨糖、Triton-X100、甘氨酸甘氨酸、柠檬酸盐、琥珀酸、乙烯、乙二醇、甘油、聚乙烯、吡咯烷酮和载体两性电解质。它们的干扰作用表现在: 增强或减弱空白颜色、增强或减弱显色程度、还原破坏试剂乙或产生沉淀等等。这些物质中有些是生物材料分析及纯化中常用的试剂, 为了使福林-酚试剂法得到更广泛的应用, 必须排除这些干扰物质的影响。

在许多情况下, 干扰物质的实际含量不知, 校正比较困难, 用蛋白质沉淀的手段来达到去除干扰物质的方法却是可行的。在具有脱氧胆酸钠的条件下, 用 6% 三氯醋酸溶液可以定量地将蛋白质沉淀下来, 然后进行测定。

试剂

1. 试剂甲和试剂乙 同前述。

2. 2% 脱氧胆酸钠溶液 2 克脱氧胆酸钠加蒸馏水至 100 毫升。

3. 24% 三氯醋酸溶液 120 克三氯醋酸加蒸馏水至 500 毫升。

操作步骤

(1) 欲测的蛋白质溶液的样品在试管中加蒸馏水至终体积为 9 毫升, 再加 2% 脱氧胆酸钠 0.075 毫升, 剧烈混和, 放置 15 分钟。加 24% 三氯醋酸溶液 3 毫升, 混和后 3500

转/分离心 30 分钟,蛋白质坚实地沉淀在管底,小心倾去上清液(上清液在管中的残留量小于 0.05 毫升)。加试剂甲 4.5 毫升,剧烈混和,蛋白质沉淀在 30 秒钟内溶解,加 0.45 毫升试剂乙,迅速摇匀。放置 30 分钟后,以不含蛋白质的试剂空白作对照在 660nm 测定光密度。

(2) 标准曲线制作: 以牛血清白蛋白在 25—250 微克范围内制作标准曲线,方法同前述基本法。

讨论

(1) 许多干扰物质通过一次沉淀就可以消除干扰影响,但有些干扰物质需进行二次沉淀,如三羟甲基氨基甲烷-盐酸(0.03M——指上述操作步骤中 9 毫升内的浓度,下同)、乙酰丙酮(0.015%)、青霉素(5 单位)+链霉素(5 微克)、酚(0.015%)。第二次沉淀的方法是将第一次沉淀再溶解于 9 毫升蒸馏水中,与第一次相同条件下进行第二次沉淀。

(2) 消除等电聚焦技术中常用的载体两性电解质的干扰影响,还需要在蛋白质沉淀前,加氯化钠到 1M 浓度,然后按上述同样步骤,通过二次沉淀可以消除干扰作用。1M 氯化钠的作用是消除空白管吸收值的不正常增加。

(3) 蛋白质溶液浓度很稀(<25 微克/毫升),不能达到本法允许的测定范围时,也可用此沉淀手段进行测定。只要使脱氧胆酸钠的浓度控制在 125 微克/毫升条件下用三氯醋酸将蛋白质完全沉淀下来,就可作进一步分析。

(三) 简易测定法^[34]

本改良法可以简化试剂配制方法,缩短测定时间。

试剂

1. 试剂甲 碱性铜试剂溶液中含 0.5N 氢氧化钠、10% 碳酸钠、0.1% 酒石酸钾和 0.05% 硫酸铜。配制时注意硫酸铜先用少量蒸馏水溶解后并入。

2. 试剂乙 与基本法中同样方法配制。临用时加蒸馏水稀释 8 倍。

操作步骤

(1) 取 1 毫升样品溶液(含 25—250 微克蛋白质),加 1 毫升试剂甲,放置 10 分钟,加 4 毫升试剂乙,迅速剧烈摇动。55℃ 恒温水浴中保温 5 分钟,用流动水冷却后,在 660nm 进行比色测定。

(2) 标准曲线制作: 用牛血清白蛋白在 25—250 微克范围内,与样品同样的操作步骤进行测定。

讨论

快速简易法可获得与 Lowry 基本法相接近的结果。

三、双缩脲法

双缩脲($\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2$)是两分子脲经 180℃ 左右加热,放出一分子氨后所得到的产物。在强碱性溶液中,双缩脲与 CuSO_4 形成紫色,称为双缩脲反应。凡具有两个酰胺基或

两个直接连接的肽键,或通过一个中间碳原子相连的肽键,这类化合物都有双缩脲反应。

双缩脲法是测定蛋白质浓度常用方法之一,它除了操作简便、迅速外,最大的优点是受蛋白质的特异性影响较小,但灵敏度差,所需样品量大。

双缩脲法的试剂配方很多,这里介绍最常用的一种。随后,人们利用铜复合物有紫外吸收的特性,使双缩脲方法能在数十微克水平进行测定,方法也不少,这里仅介绍一种。

(一) 双缩脲常量法^[36]

允许测定范围——含蛋白质 0.2—1.7 毫克/毫升。

试剂

1. 碱性铜试剂 0.175 克硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶解于约 15 毫升水中,置于一 100 毫升容量瓶中,加入 30 毫升浓氨水,30 毫升冰冷的蒸馏水及 20 毫升饱和氢氧化钠溶液,混匀后,放置至使溶液温度与室温相同,以蒸馏水稀释至刻度,摇匀。此试剂在室温下可以放置 3—4 个月不影响显色。

2. 蛋白质标准溶液 纯蛋白质(恒重)配制成 1.5 毫克/毫升溶液。(含量用称重法或定氮法精确确定。)

操作步骤

1. 标准曲线制作 每组取 7 支试管,依次加入蛋白质标准溶液 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 毫升,分别补足蒸馏水至 3 毫升(各管相当于含蛋白质 0、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25 和 1.5 毫克/毫升),混匀后各管加 2 毫升碱性铜试剂,充分混和后,呈现紫色,立即于 540nm 下测定光密度(以第一管作空白对照)。

2. 未知样品测定 取 3 毫升样品溶液,加入碱性铜试剂 2 毫升,充分混匀后,于 540nm 下测定光密度,操作条件同标准曲线。

讨论

样品溶液与试剂混合后,有时约 30 分钟后有雾状沉淀产生。这种现象对含脂肪类物质的蛋白质抽提液较易发生,而对于纯蛋白质溶液不明显。克服的方法有三种:(1) 加入试剂后立即比色,至少应在 30 分钟内完成;(2) 如沉淀已经产生,则索性放置二小时或更多时间,离心去沉淀后取清液比色;(3) 加 1.5 毫升乙醇或石油醚,离心后比色。

(二) 双缩脲半微量法^[37]

允许测定范围——含蛋白质 25—500 微克/毫升。

伴随着铜-蛋白质复合物的形成,蛋白质的紫外吸收光谱发生了变化。利用这一特性,在双缩脲法中选用了在紫外光区域进行分析,已有选用 263nm、310nm 及 330nm 等波长的各种测定方法。所选用的波长越靠近 263nm,灵敏度越高;但干扰的因素也越大,尤其是核酸类物质的干扰。这里介绍在 310nm 的测定方法,可以兼顾两方面的长处。

试剂

1. 试剂甲 0.21 克硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 加少量水溶解后,加入 75 毫升

40%(W/V) 的氢氧化钠溶液,加水至 100 毫升。

2. 试剂乙 30%(W/V) 的氢氧化钠溶液。

3. 蛋白质标准溶液 纯蛋白质(恒重)配成 0.5 毫克/毫升。

操作步骤

(1) 每组测定取 4 支试管,按下列加入:

(A₁) 2 毫升蒸馏水 + 1 毫升试剂甲

(A₂) 2 毫升蛋白质溶液 + 1 毫升试剂甲

(B₁) 2 毫升蒸馏水 + 1 毫升试剂乙

(B₂) 2 毫升蛋白质溶液 + 1 毫升试剂乙

各管充分混匀,5 分钟后在 310nm 测定光密度。分别以 A₁ 为对照测定 A₂,得 D_A;以 B₁ 为对照测定 B₂,得 D_B。取 D_A—D_B,从标准曲线求得蛋白质浓度。

(2) 标准曲线制作:与样品测定步骤相同,取蛋白质标准溶液(0.5 毫克/毫升)0.5、1.0、1.5 和 2.0 毫升,分别补加蒸馏水至 2.0 毫升。同前操作步骤。最后以 D_A—D_B 对蛋白质浓度作图即可。

讨论

下列物质对测定没有干扰:脱氧核糖核酸(0.7 毫克/毫升),氯化钠(1.5N),醋酸钠(0.1N),甲酸钠(0.75N),过氯酸(0.67N),磷酸氢二钠(0.01M)。(括号内浓度是指所加 2 毫升蛋白质溶液中的浓度。)

硫酸铵使 D_A—D_B 值下降,脲使 D_A—D_B 值增加。

四、紫外吸收法

蛋白质分子中所含有的酪氨酸和色氨酸残基使蛋白质在 280nm 下具有最大吸收值;蛋白质溶液在 238nm 下的光吸收值,其吸收强弱与肽键量成正比。利用这一定波长范围内吸收值与蛋白质浓度的正比关系可以进行蛋白质含量的测定。

紫外吸收法操作简便,快速,所需样品量少,经测定后样品仍能回收使用。低浓度的盐并不干扰测定,适合于柱层析洗脱液的测定,这对连续自动装置也很有利。但是由于许多物质都可能在紫外部分引起光吸收,因而干扰因素较多。

这里介绍四种测定方法。

(一) 280 毫微米的光吸收法^[38,39]

本法利用蛋白质分子中酪氨酸、色氨酸在 280 毫微米左右具有的最大吸收。由于在各种蛋白质中这几种氨基酸的含量差别不大,因此 280 毫微米的光吸收值是蛋白质一种普遍性质。

测定时,将待测蛋白质溶液放在比色槽中,直接在 280 毫微米读取光密度。蛋白质浓度可控制在 0.1—1.0 毫克/毫升左右。通常,在光径为 1 厘米的比色槽中,装有每毫升含 1 毫克蛋白质(此蛋白质的氨基酸含量较适中时)溶液时,其 280 毫微米处的光密度为 1

左右。所以,根据光密度读数立即可以估计出蛋白质的大致浓度。

本法对于几种酪氨酸及色氨酸含量相仿的蛋白质误差较小,而对于这些氨基酸的含量相差悬殊的蛋白质误差较大。许多蛋白质在一定浓度一定波长下的光吸收值有文献可查,根据此值可较准确地计算蛋白质浓度^[40]。表 3.4 列举某些蛋白质的 $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ (蛋白质溶液浓度为 1%, 光径为 1 厘米时的光吸收值)。

表 3.4 某些蛋白质在一定波长下的 $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ 值^[40]

蛋白质种类	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$	波长 nm	溶剂系统	蛋白质种类	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$	波长 nm	溶剂系统
血清白蛋白(牛)	6.3	280	水	胰蛋白酶(牛)	15.3	280	液, 0.1N NaCl, 10 ⁻³ M EDTA
	270	210					
	840	191					
(人)	7.15	280		胃蛋白酶(牛)		280	
	190	210		枯草杆菌蛋白酶 (Carlsberg)	9.6	280	
珠蛋白 (人)	10.62	280	40% 脲, 0.02N NaOH	(BPN')	11.7	280	0.01NHCl pH7.5 磷酸盐缓冲液
(牛)	7.9	280		木瓜蛋白酶	21.5	280	
血纤蛋白 (人)	15	280		核糖核酸酶(牛胰)	7.56	277.5	
(牛)	16.84	282		核酸内切酶 (E. coli RI)	8.3	278	
肌动蛋白 (兔)	11.08	280		α -淀粉酶(枯草杆菌)	25.6	278—280	
肌动球蛋白(兔)	8.01	290	pH13	(人尿)	21.2	280	pH7, 0.001 M 磷酸盐缓冲液
肌红蛋白 (人)	17.4	280		β -淀粉酶(大豆)	17.0	280	
肌球蛋白 (兔)	5.5	280		蔗糖酶(兔肠)	14.8	279	
弹性蛋白	5.65	276		α -半乳糖苷酶 I (Vicia faba)	18	280	
α -乳清蛋白(人)	16.2	280		α -半乳糖苷酶 II (Vicia faba)	20	280	
β -乳球蛋白(牛)	10.80	280	pH7, 0.01M 磷酸盐缓冲液	β -半乳糖苷酶 (E. coli, K12)	19.1	280	pH7, 0.001 M 磷酸盐缓冲液
卵白蛋白	7.60	280		溶菌酶	22.8	280	
卵粘蛋白	10.3	290			320	210	
卵类粘蛋白	4.1	280		碱性磷酸酯酶(牛肠)	7.6	278	
细胞色素 c	19.5	280		酸性磷酸酯酶(鼠肝)	6.18	278	
	290	210	pH3	(土豆)	9.1	280	8.9 280
IgG	13.8	280		果糖-1, 6-二磷酸酶 (兔肝)	8.9	280	
IgA	13.4	280		醇脱氢酶(马肝)	4.55	280	
IgE(PS)	12.5	280		(酵母)	12.1	280	
IgE(ND)	15.33	280		3-磷酸甘油醛脱氢酶 (兔)	12.7	280	
IgM	14.5	280	pH6.8, 0.01M 磷酸盐缓冲液	(酵母)	9.4	280	
胰岛素(牛)	9.91	276					
胰岛素原(牛)	5.9	276					

(二) 280 毫微米和 260 毫微米的吸收差法^[41, 42]

在生物制剂中,往往含有核酸类物质,它们的紫外部分光吸收也很强,对蛋白质测定有干扰。利用核酸类物质的吸收值在 260 毫微米大于 280 毫微米,而蛋白质的吸收值在 280 毫微米大于 260 毫微米的相反特性,于 280 毫微米及 260 毫微米下测定光密度,根据

其吸收差求算浓度,一般可按下式粗略地计算。

$$\text{蛋白质浓度(毫克/毫升)} = 1.45D_{280} - 0.74D_{260}$$

D_{280} 和 D_{260} 分别为蛋白质溶液在 280 毫微米和 260 毫微米下测得的光密度。上述公式是通过一系列已知不同浓度比例的蛋白质(酵母烯醇化酶)和核酸(酵母核酸)混合液测定的数据所建立的。

(三) 215 毫微米和 225 毫微米的吸收差法^[41]

蛋白质的稀溶液由于含量低而不能使用 280 毫微米的光吸收测定。由 215 毫微米和 225 毫微米吸收值之差求算蛋白质浓度适合于蛋白质稀溶液的测定。将已知的蛋白质溶液(20—100 微克/毫升)在 215 毫微米和 225 毫微米测得光密度,并一一以下式计算吸收差:

$$\text{吸收差 } \Delta = D_{215} - D_{225}$$

式中, D_{215} 和 D_{225} 分别为蛋白质溶液在 215 毫微米和 225 毫微米下测得的光密度。然后以吸收差 Δ 为纵座标,蛋白质浓度为横座标,制作标准曲线。同样,未知样品在测得 215 毫微米和 225 毫微米的光密度后,可根据吸收差 Δ 直接从标准曲线中查得浓度。

本法在蛋白质含量达每毫升 20—100 微克的范围内,蛋白质浓度与光密度成正比。氯化钠、硫酸铵以及 0.1M 磷酸、硼酸和三羟甲基氨基甲烷等缓冲液都无显著干扰作用。但是,0.1N 氢氧化钠、0.1M 醋酸、琥珀酸、邻苯二甲酸、巴比妥等缓冲液,在 215 毫微米下的吸收较大,必须将其浓度降到 0.005M 才无显著影响。

(四) 肽键测定法^[42]

蛋白质溶液在 238 毫微米下均有光吸收,其吸收强弱与肽键多少成正比。根据这个特性,可以将一系列已知不同浓度(50—500 微克/毫升)的蛋白质溶液在 238 毫微米下测光密度,并以光密度为纵座标,蛋白质含量为横座标绘制标准曲线。未知样品的浓度即可根据标准曲线求得。

在柱层析或区带电泳等分离工作中,若欲寻找蛋白质峰位,也可直接将洗脱液在 238 毫微米下读取光密度求得相对量。本法比 280 毫微米吸收法灵敏,但多种有机物,例如醇、酮、醛、醚、有机酸、酰胺类和过氧化物等都有干扰作用,最好用无机酸、无机碱和水溶液。若含有机溶剂,可先将样品蒸干,或用其他方法除去干扰物质,然后用水、稀酸或稀碱溶解后再作测定。

最后要指出,进行紫外吸收法测定时,由于蛋白质吸收高峰常因 pH 的改变而有高低,因此要注意溶液的 pH,测定样品时最好与标准曲线制作时的 pH 一致。

五、考马斯亮蓝染色测定法^[43]

原理

将蛋白质样品固定在各种类型纤维膜上,与各种类型染料结合后,把被染色的蛋白质洗脱下来,在适当的波长下进行比色测定。这种方法的特点是灵敏度高,可以测定几微克,甚至零点几微克水平的蛋白质,只需少量蛋白质溶液就可分析测定。

这里选用层析滤纸为支撑物质,三氯醋酸为固定剂,考马斯亮蓝为染料的测定方法。

考马斯亮蓝和蛋白质通过范德瓦耳引力结合。本法可允许的测定范围是2—20微克蛋白质。受蛋白质的特异性影响较小,除组蛋白外,其他不同种类蛋白质的染色强度差异不大。

试剂

1. 染色液 0.25克考马斯亮蓝R-250溶解于含7.5%醋酸,5%甲醇的水溶液100毫升中。
2. 20%三氯醋酸溶液 20克三氯醋酸加蒸馏水至100毫升中。
3. 脱色液 含7.5%醋酸和5%甲醇的水溶液。
4. 洗脱液 含0.12N氢氧化钠的80%的甲醇溶液。
5. 3N盐酸溶液 25毫升12N盐酸加蒸馏水至100毫升。
6. 蛋白质标准溶液 纯蛋白质精确配成1毫克/毫升。
7. 层析滤纸

操作步骤

1. 点样 在层析滤纸上,点加蛋白质样品20微升(含蛋白质2—20微克),使完全吸附,充分吹干。
2. 固定 点好样的滤纸浸没在20%三氯醋酸溶液中5—10分钟,时时轻轻搅动。
3. 染色 将三氯醋酸固定好的滤纸浸没在染色液中,30℃染色60分钟(也可取其他染色温度或染色时间,温度及时间分别达到 $\pm 1^\circ\text{C}$ 及 $\pm 1'$)。
4. 脱色 为了除去未与蛋白质结合的染料,需充分脱色。将已染色的滤纸浸没在脱色液中,十余分钟或更长时间。如此反复数次,至滤纸背景基本无色。
5. 洗脱 剪下滤纸的染色蛋白质部分(空白管剪取滤纸背景部分,同样大小面积),分别放入试管中,加1.8毫升洗脱液,摇动,室温放置,使滤纸片没有颜色为止,约5分钟。再加0.09毫升3N盐酸;摇动,显现蓝色。(如果滤纸破碎,需离心除去)
6. 比色 取清液放入0.5厘米光径的比色杯,以空白管作对照在590毫微米进行比色测定,读取光密度值。
7. 标准曲线制作 取蛋白质标准溶液(1毫克/毫升)各点样5、10、15、20微升;或先将蛋白质标准液稀释成0.25、0.5、0.75及1毫克/毫升,分别点样20微升于层析滤纸上(相当蛋白质含量2.5、5、7.5及10微克),然后在上述样品测定的同样条件下操作。(注意剪取同样大小面积的滤纸片进行洗脱)。

讨论

(1) 在操作步骤中,染色强度随温度升高或染色时间的延续而加强,因此要选用恒定的染色温度和染色时间。另外,低温有利于固定。

(2) 洗脱下来的比色溶液颜色,至少可放置12小时而稳定,但必须避光保存,否则长时间见光会使颜色减退。

(3) 使用过的脱色液加少量活性炭,过滤后可反复使用。

(4) 大多数物质对测定没有干扰。例如:脲(5M),氯化钠(2M),Tris-HCl(0.1M),

二硫苏糖醇 (0.001M), 硫酸钠 (0.01M), 甘油 (30%), 硫酸铵 (0.3M), 氯化镁 (0.1M), 氯化钾 (2M), 磷酸氢二钠 (0.3M), Triton-100(1%)。核酸也没有干扰。但 1% 十二烷基磺酸钠 (SDS) 可使显色程度减弱 50% 以上; 1% 脱氧胆酸钠和 1% 十二烷基肌氨酸钠 (Sarkosyl) 破坏线性关系。

第四节 蛋白质的末端测定

大多数蛋白质由一条肽链组成, 也有些蛋白质例如胰岛素、胰凝乳蛋白酶、免疫球蛋白、血红蛋白和乳酸脱氢酶有一条以上的肽链组成。每条肽链的一端具有游离的 α -氨基 (氨基末端或 N-末端), 另一端则为游离的 α -羧基 (羧基末端或 C-末端)。

1945 年 Sanger 首先把二硝基氟苯用于胰岛素 N-末端的测定, 为研究蛋白质的细微化学结构开辟了新的领域。30 多年来, 由于层析、电泳等分离分析技术的进展, 促使末端分析的技术迅速发展。末端分析技术已进一步发展成为解决蛋白质化学结构的基本工具, 为解决蛋白质结构和功能的关系开辟了途径。

末端测定的方法很多, 这里仅介绍常用的 N-末端的二甲氨基萘磺酰氯法 (DNS-Cl 法) 和 C-末端的胍解法。其它常用于 N-末端测定的二硝基氟苯法 (FNB 法) 和异硫氰酸苯酯法 (PTH 法) 以及用于 C-末端测定的羧肽酶法可详细参阅潘家秀等编著的“蛋白质化学研究技术”。

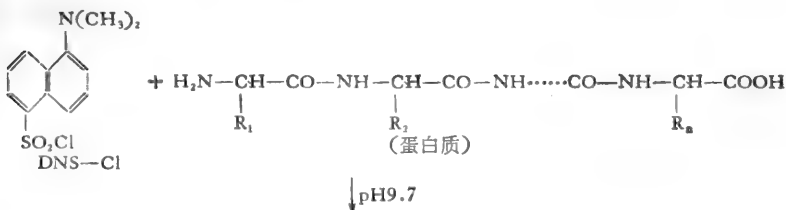
一、N-末端测定——二甲氨基萘磺酰氯法^[1,44]

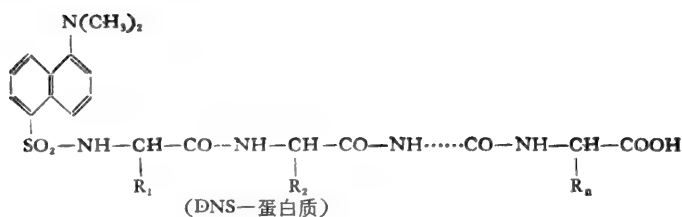
原理

二甲氨基萘磺酰氯 (1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl chloride, 简称 DNS-Cl) 与氨基酸或肽的游离氨基形成的磺胺衍生物在紫外光 (365nm) 照射下具有强烈的黄色荧光。蛋白质的 N-末端的游离氨基与 DNS-Cl 缩合生成 DNS-蛋白质。在 5.7N HCl, 105°C 水解 18 小时, DNS-蛋白质的肽键被打开, 而由于 DNS 基团和氨基之间的键牢固结合, 除 DNS-色氨酸全部破坏和 DNS-脯氨酸 (77%), DNS-丝氨酸 (35%), DNS-甘氨酸 (18%), DNS-丙氨酸 (7%) 部分破坏外, 其余 DNS-氨基酸很少破坏。所形成的 DNS-氨基酸在酸性条件下, 可用乙酸乙酯抽提, 通过层析鉴定出 N-末端氨基酸的种类。

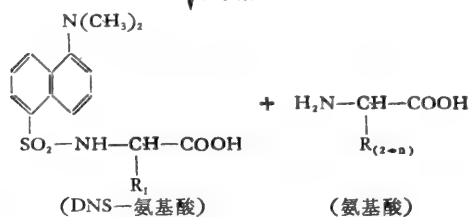
本法比二硝基氟苯法灵敏度高 100 倍, 可测定 1nmole 的样品。酸水解时, DNS-氨基酸比 DNP-氨基酸稳定, 操作也简便。

反应过程如下:

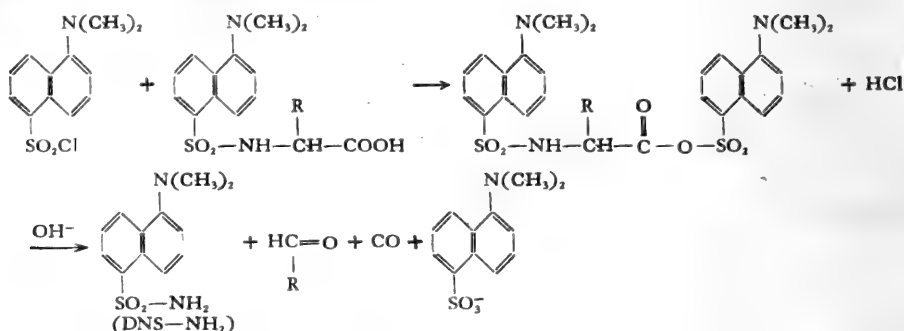




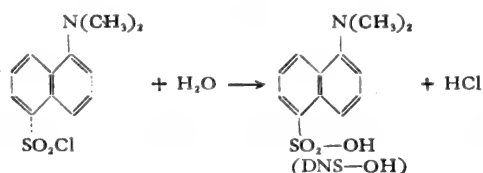
↓ 酸水解



在有过量 DNS-Cl 存在下,有副产物 DNS-NH₂:



在 pH 高的情况下, DNS-Cl 要水解,有副产物 DNS-OH:



DNS-NH₂ 和 DNS-OH 在紫外光照射下产生蓝色萤光,可以与 DNS-氨基酸所呈现的黄色萤光区别开来,在层析图谱上还可以借助它们的相对位置来确定氨基酸的种类。

操作步骤

1. DNS-肽或 DNS-蛋白质的制备

DNS-肽的制备: 肽样品溶液 (0.1-1nmole) 置于小试管 (4 × 30 毫米), 真空干燥后, 加 10—15 微升 0.2M 碳酸氢钠溶液 (如果需要, 溶液再真空抽干以除去微量氨, 干物质再溶解于 15 微升无离子水) 及等体积 DNS-Cl 丙酮溶液 (2.5 毫克/毫升), 这时要求终浓度分别为: 肽 1mM、DNS-Cl 5mM 及丙酮 50%。并要求 pH 达到 8.5—9.8, 如果 pH 偏低, 再加入碱调节。胶布封口后, 37℃ 保温 1 小时。反应结束后, 真空干燥得 DNS-肽。

DNS-蛋白质的制备: 10nmole 蛋白质样品溶解于 0.5 毫升含 8M 脲的 0.5M 碳酸氢钠溶液中 (溶液中应不含有氨及氰酸盐), 加 DNS-Cl 丙酮溶液 (20 毫克/毫升) 0.5 毫升, 混和后, 室温放置过夜或 37℃ 放置数小时。反应液中的盐和脲的清除——如果 DNS-蛋白

质呈沉淀状态,则离心和洗涤去盐;如果 DNS-蛋白质呈溶解状态,则可以透析去盐,或通过 Sephadex G-25 小柱层析,蛋白质带的移动可借助紫外灯观察,操作迅速。脱盐后的 DNS-蛋白质真空干燥。

2. DNS-肽和 DNS-蛋白质的酸水解 大多数情况下,不必从反应液中除去 DNS-OH。将 DNS-肽加 50 微升(或 DNS-蛋白质加 0.5 毫升) 5.7N 盐酸,在试管抽空下将管口封闭,于 105℃ 水解 16—18 小时。(以缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸为 N-末端时水解时间应该加长;以脯氨酸为 N-末端时水解 6 小时。)

3. DNS-氨基酸的抽提 水解结束后,真空抽干除去盐酸,干物质加少量水溶解,在 pH2—2.5 条件下用乙酸乙酯抽提 2—3 次,合并抽提液,适当减压浓缩得 DNS-氨基酸。副产物 DNS-OH 可留于水相。若是 DNS-Arg, DNS-Asp, DNS-Glu, DNS-Thr, DNS-Ser 则它们大部分或部分留于水相,往往会遗漏而导致错误结论。这时可将样品浓缩干,用甲醇直接溶解后点样层析鉴定。

4. DNS-氨基酸的鉴定 可用纸电泳、纸层析、硅胶层析及聚酰胺薄膜层析等方法鉴定。这里选用聚酰胺薄膜双相层析,简易快速, DNS-氨基酸在聚酰胺薄膜上的荧光点不易消失。

双相层析时,取聚酰胺薄膜(制备方法见附录) 5 × 5 厘米,在左下角距二边 0.7 厘米处点样,点样直径不超过 2 毫米。用下列溶剂系统进行展层。

溶剂系统 I: 1.5% 甲酸。

溶剂系统 II: 苯/冰醋酸 (9:1V/V)。

溶剂系统 III: 乙酸乙酯/冰醋酸/甲醇 (20:1:1V/V)。

溶剂系统 IV: 0.05M 磷酸三钠于 25% 乙醇中。

一般情况下用两个溶剂系统展层。即: 溶剂系统 I 用作第一相展层,层析后取出薄膜除尽溶剂,以溶剂系统 II 作第二相展层。取出膜并待膜干燥后于紫外层析灯下观察并记录斑点的位置。

如果 DNS-天冬氨酸和 DNS-谷氨酸、DNA-丝氨酸和 DNS-苏氨酸、DNS-赖氨酸和 DNS-组氨酸之间分不开时,或 DNS-丙氨酸超过 DNS-OH,那么,在第二相展层后用溶剂系统 III 进行第三次展层。

如果 DNS-精氨酸和 DNS-赖氨酸仍分不开,可在第二相用溶剂系统 IV 进行第四次展层。

将紫外灯下检出的 DNS-氨基酸位置与标准图谱(图 3.7) 比较,就可确定 N-末端氨基酸的种类。

标准 DNS-氨基酸可按下列步骤制备: 氨基酸溶液 (2mM, 用 0.2M 碳酸氢钠溶液配制, pH9 左右), 加等体积 DNS-Cl 丙酮溶液 (2.5 毫克/毫升), 摇匀, 以胶布封住管口, 37℃ 保温 30 分钟。取出, 真空抽去丙酮, 以 1N 盐酸酸化至 pH2—2.5, 加入乙酸乙酯抽提, 上层产生黄色荧光的溶液即含 DNS-氨基酸。

讨论

(1) DNS-Cl 除了与 α -氨基反应外, 还能与蛋白质的侧链基团巯基、咪唑基、 ϵ -氨基和酚基反应, 但前两者在酸、碱条件下均不稳定, 酸水解时完全破坏; 而 DNS- ϵ -赖氨酸

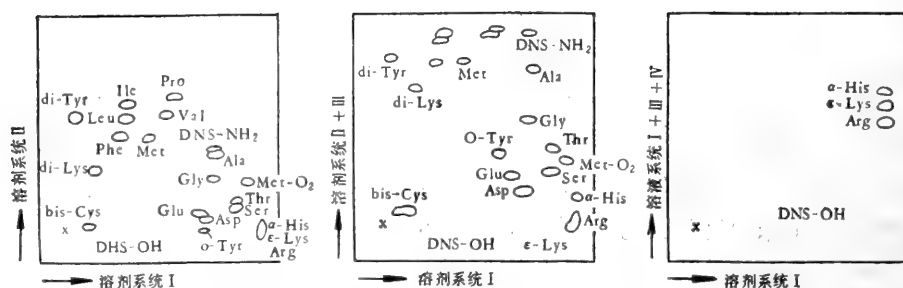


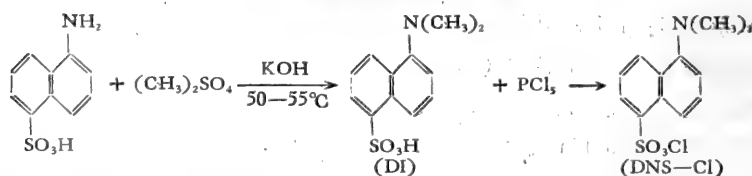
图 3.7 DNS-氨基酸标准图谱
DNS-氨基酸在薄膜上检测灵敏度为 0.01 微克,也即相当于 10^{-10} 克分子浓度。

及 DNS-O-酪氨酸可以从层析位置与来源于 N-末端的赖氨酸或酪氨酸所产生的 DNS-双-赖氨酸或 DNS-双-酪氨酸区别之。

(2) 本法定量比较困难,这里不作介绍。

附 录

一、二甲氨基萘磺酰氯的制备*



(一) 1-二甲氨基-5-萘磺酰酸 (DI) 的制备

在 500 毫升三颈烧瓶中,称入 10 克 1-氨基-5-萘磺酸和 100 毫升水,在搅拌下加入 40—45 毫升 25% 氢氧化钾,原料渐渐溶解,外用水浴加热到 50—55°C,在剧烈搅拌下缓慢滴加 $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ 20 毫升,约半小时,在滴至剩余五分之一时,已有沉淀产生,滴完 pH 约为 3—4,再继续搅拌 20 分钟,倾入 500 毫升三角烧杯内,用 6N HCl 调至 pH = 1,有大量析出,冷却放置一小时后过滤,得灰红色片状结晶,即是 DI 粗制品。

将 DI 粗制品加 100 毫升水,用 30% 氢氧化钾 pH = 10,加热到沸腾全溶,用活性炭脱色,过滤,滤液用酸酸化到 pH1,即有大量结晶析出,冰箱放置过夜,过滤,干燥,得闪光粉红色结晶约 7—8 克,熔点 210—215°C。若不纯,可重复用水重结晶,加水煮沸,调 pH5 使溶解,滤去不溶物,滤液调至 pH1,冷却结晶,过滤,得 DI 结晶。

(二) 1-二甲氨基-5-萘磺酰氯 (DNS-Cl) 的制备(将干燥箱置于通风橱内操作)

在 23 厘米直径的研钵中称入 8 克 DI,使均匀分布在器壁,称取 PCl_5 15 克,倒入研钵,迅速磨碎,和 DI 混和(反应放热,有氯逸出),成粘稠灰棕色物。即将它渐滴入盛有 100—150 毫升冰和水的烧杯内,不断搅研,使成黄色油状物粘附于烧杯器壁和底部,空研钵也用冰水处理(反应物中有多余 PCl_5 ,遇水放热,会使生成的 DNS-Cl 重新分解,故在倒进冰水内时,要用力研搅使保持低温),合并两部分冰水,留下的黄色油状物用乙酸乙酯抽提数次,到抽提液呈淡黄色止,冰水也用乙酸乙酯抽提,合并抽提液约 700 毫升,用无离子水洗 3—4 次,至洗涤至 pH6 为止。将洗过的乙酸乙酯置氯化钙干燥 1—2 天。过滤,氯化钙用少量乙酸乙酯洗两次。洗涤液于低于 40°C 的水浴内抽干,得粗结晶。再用 60—90°C 石油醚溶解,过滤,滤去棕色不溶性油粘物(少量),滤液于低于 30°C 的水浴内抽干,得橙色的结晶 DNS-Cl。熔点 67—69°C。如去掉灯泡瓶底部分(熔点 67—69°C),得淡橙色结晶,熔点 72—74°C,置干燥器内用 P_2O_5 干燥数天,得产品 5 克。

* 中国科学院生物化学研究所东风试剂厂提供资料。

二、聚酰胺薄膜的制备*

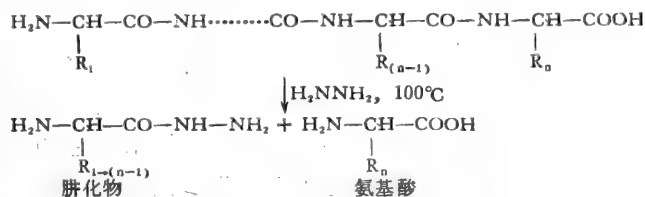
涤纶片基,切成 17×35 厘米,浸入 10% 氢氧化钠与工业乙醇 (1:1) 混合液过夜,以清水冲洗干净直至膜面不挂水为止。洗净的涤纶片基趁湿贴在玻璃板上,片基两侧贴上厚度为 0.4 毫米的聚氯乙烯条,待片基表面凉干后,将玻璃板放在通风橱的水平木板上。只有木板达到水平位置,才能保证膜的均匀。

在 100 毫升烧杯内,称入聚酰胺(锦纶)5 克,加甲酸 (85%) 25 毫升,用表面皿盖好,电磁搅拌溶解,约 2—3 小时后成透明清液。将清液倒在水平板上的涤纶片基上,立即迅速用玻棒或拉模推动,使液体均匀铺在片基上。(甲酸是易挥发腐蚀的酸,需戴口罩及手套在通风橱内操作)膜铺好后,立即关闭通风橱,让甲酸缓慢挥发过夜,次日,在空气中吹干。不能用高温烘干,高温易使膜变形和断裂。干后,裁成所需大小。

二、C-末端测定——胍解法^[1,2,45]

原理

蛋白质与胍在无水情况下加热作用,蛋白质的 C-端氨基酸分解出来,其他氨基酸转化成它们相应的胍化物。胍解下来的 C-端氨基酸借分级抽提及二硝基氟苯试剂作用等方法,再用滤纸层析法鉴定,就可知道该蛋白质的 C 端氨基酸种类和数目。



操作步骤

1. 无水胍的制备——甲苯混合蒸馏法

50 克 80% 的水合胍,500 克甲苯与 500 克的生石灰在磨口蒸馏瓶中混和。盖上磨口玻塞,放置过夜。次晨,连上磨口冷凝管,在冷凝管顶上装上氢氧化钠干燥管,以小火回流 3 小时。回流完毕就改成蒸馏装置,蒸馏之。胍与甲苯成共沸混合物在 93—94℃ 蒸出,此时胍就沉于容器底部而上相是甲苯层。这样得到的胍已相当纯,不必再去纯化脱水。用橡皮头滴管小心插过甲苯层,吸取底层的无水胍约 2 毫升,并一一装于玻管内封闭之,置阴凉处保存。因无水胍易吸水失效(高纯度的胍在空气中冒白烟),故此步宜极迅速。此法比较安全,容易控制。

2. 胍解反应及游离氨基酸的抽提

(1) 非催化胍解及醛类抽提法: 50 毫克 (0.2—1.0 微克分子) 蛋白质样品置于小试管中,在 105℃ 干燥 6 小时,迅速移置于五氧化二磷的干燥箱内。箱内预先准备小锉刀一把,当样品冷却后,就把双手伸入干燥箱橡皮手套,用小锉刀切开无水胍的玻璃管,以橡皮头滴管吸取 0.5 毫升的无水胍,加入样品管中,在箱中塞上小橡皮塞,迅速取出于煤气灯上封闭之。胍的用量不宜太多,样品管封闭完毕就置于 100℃ 加热 4—24 小时,胍解时间随蛋白质种类而定。胍解时间短则 C-端氨基酸释放不完全,得到 C-端多肽,胍解时间长则

* 浙江黄岩化学分析材料厂已有商品生产。

C-端氨基酸释放完全，C-端多肽就消失。

作用完毕，割开玻管并置于硫酸干燥器中，以水泵抽干，多余的胍就会自管中渐渐逸出而被浓硫酸吸收成硫酸胍回收。残渣以1毫升水分三次洗涤，洗涤液合并置于离心管中，加入约0.5毫升的新鲜蒸出的苯甲醛，振荡2小时，离心取出上清液，苯甲醛层再以0.2毫升水洗一次，洗涤液合并于上清液中。苯甲醛层中含有很多氨基酸的胍化物，可弃去之，大部份的胍化物均于此步除去。

(2) 树脂催化胍解及柱层析法：50毫克干Amberlite CG-50树脂(小于200目，经1N氢氧化钠蒸馏水，2N盐酸顺序处理，水洗至无氯离子后，80℃干燥，保存于盛有五氧化二磷的真空干燥器中备用)和0.25微克分子左右蛋白质样品，置于厚壁硬质玻管(15×125毫米)，加2毫升无水胍。按上述同样方法封管。80℃胍解60—100小时(第一天摇动3—4次)。如果反应结束后不立即分析，不要开口置于冰箱保存。

胍解结束后，迅速移至25毫升圆底烧瓶中，并用1毫升未重蒸的胍(95%+)洗试管2次。操作时注意经常关闭瓶口，以避免吸湿。全部物质一起在异丙醇、干冰浴中充分冻干，在冻干的3小时内，胍逃逸而移去。冻干物质中含有树脂，胍化物及游离氨基酸，悬浮于3毫升水中，离心除去树脂并用1毫升水洗二次。合并水溶液(pH8.5—9)，在层析前加几滴2N HCl，使pH1.5—2.0。

层析可以除去大量的氨基酸胍化物，而得到游离氨基酸。操作步骤为：Amberlite IR-120(150A型)，柱1×18厘米，预先用pH3.1，0.2M吡啶醋酸缓冲液平衡。胍解反应液于pH1.5—2.0上柱，以同样pH3.1缓冲液洗脱，并控制流速30毫升/小时，每2毫升收集1管。这时全部氨基酸胍化物吸附在树脂上，而酸性和中性氨基酸在第8—30管，酪氨酸在第54—60管洗脱下来，当洗脱液改用pH5.2、0.2M吡啶-醋酸缓冲液后，赖氨酸在洗脱液达pH5.2后的10管内洗脱下来。(组氨酸可用pH5.2，0.4M吡啶-醋酸缓冲液洗脱下来，但这时胍化物也一起下来，因此，本法对组氨酸不适用，可改用磷酸纤维素柱层析)

树脂再生时，水洗后，与0.5N氢氧化钠一起煮沸1小时，过滤后，用水和酸相继洗涤，最后用pH3.1缓冲液平衡。

上述两种方法，非催化胍解的回收率较低，某些氨基酸遭到破坏而不易测出，如胱氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺及天冬酰胺，其他如谷氨酸及天冬氨酸的回收率也低。其余氨基酸的回收率均在40—60%。而树脂-催化胍解除赖氨酸外，均可以提高回收率。各种氨基酸在不同胍解条件下回收率见表3.5。

3. 氨基酸的鉴定

C端释放的游离氨基酸可以用现存的任何方法进行检出及定量。也可以结合运用二硝基氟苯法。将上述抽提的含游离氨基酸的上清液(约1毫升)加入0.5毫升6%NaHCO₃溶液，再加入3毫升2.5%二硝基氟苯乙醇溶液，于室温下振荡90分钟。作用完毕，用氮气吹尽大部分的乙醇，并以20毫升水稀释之。以2N盐酸酸化，用乙醚(4×10毫升)抽提至乙醚层无黄色为止。将合并的乙醚溶液用25毫升2%NaHCO₃抽提3次，并以少量乙醚洗涤之。用2%NaHCO₃抽提DNP-氨基酸时，过剩的FDNB就留在乙醚中。然后将NaHCO₃溶液酸化，再以乙醚抽提，此时DNP-氨基酸又被抽回乙醚层。于灯泡瓶中抽气驱除溶剂，除去二硝基苯酚。

表 3.5 各种氨基酸胍解后的回收率(%)

氨基酸	非催化水解 100℃10 小时	amberlite 树脂催化胍解 80℃				备 注
		11 小时	40 小时	82 小时	112 小时	
赖氨酸	47	41	37	31	29	测定鸟氨酸
组氨酸	43	88	85	73	60	
精氨酸	25	—	—	—	—	
天冬氨酸	19	77	40	24	20	
苏氨酸	52	92	80	79	68	
丝氨酸	39	84	67	67	51	
谷氨酸	16	81	44	39	35	
脯氨酸	52	100	96	88	75	
甘氨酸	37	92	69	60	57	
丙氨酸	45	96	85	79	74	
缬氨酸	76	101	100	108	96	测定甲硫酸亚砷
甲硫氨酸	56	90	86	87	79	
异亮氨酸	54	101	104	107	103	
亮氨酸	54	99	94	90	93	
酪氨酸	44	95	91	92	83	
苯丙氨酸	59	96	91	93	85	
色氨酸	39	—	—	—	—	
半胱氨酸	—	77	52	25	0	

DNP-氨基酸双相纸层析,使用甲苯系统和 pH6.0 磷酸盐缓冲液系统。

甲苯系统: 甲苯:吡啶:氯乙醇 (5:1.5:3) 按所需量(大约 25:7.5:15 毫升/张滤纸)先在分液漏斗中充分摇匀,然后以 0.5N 氨水 (15 毫升/张滤纸)慢慢地成细流状加入,此时不可振摇,待两相平衡四小时后放出下层氨水,下层氨水用作层析时滤纸平衡,有机相用于层析。

pH6.0, 1.5M 磷酸盐缓冲液系统: 138 克 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 71 克 Na_2HPO_4 溶解于蒸馏水,定容至 1 升。

层析时,滤纸 (28 × 32 厘米)点样后,呈圆筒形放入层析缸,先用氨水平衡 3—5 小时,再以甲苯系统有机相用长颈漏斗自顶上小孔加入放滤纸的培养皿中。第一相层析的好坏往往取决于平衡,所以平衡后,加溶剂时缸盖不得轻易打开,以免缸内蒸气逸出而使样品点子“拖尾巴”。约 14—16 小时后,第一相层析完毕,取出,在暗处吹尽纸上溶剂,转过 90° 角度,再做成圆筒形进行第二相层析,用 pH6.0 磷酸盐缓冲液系统,不需要平衡,层析 5—8 小时。

层析完毕,取出暗处吹干。根据层色图谱上的黄色斑点的位置,对照标准图谱 (图 3·8)确定是什么 DNP-氨基酸。

定量时,将黄色斑点剪下,置干燥试管中,加 4 毫升 1% NaHCO_3 溶液洗脱 20 分钟。如滤纸纤维散布于溶液,可离心除去。将澄清的洗脱液在波长 360 毫微米测定其光密度 (DNP-脯氨酸和 DNP-羟脯氨酸在 385 毫微米测定),并剪下同样大小的空白纸片,以 4 毫升 1% NaHCO_3 溶液同样洗脱操作,以作空白对照。

非醚溶性的 DNP-氨基酸的鉴定: 取已蒸干的水溶液残渣以酸丙酮溶解,用正丁醇:醋酸:水 (4:1:5) 作层析溶剂,单相就可分开 (图 3·9)。黄色水溶液中的成份比较复杂,

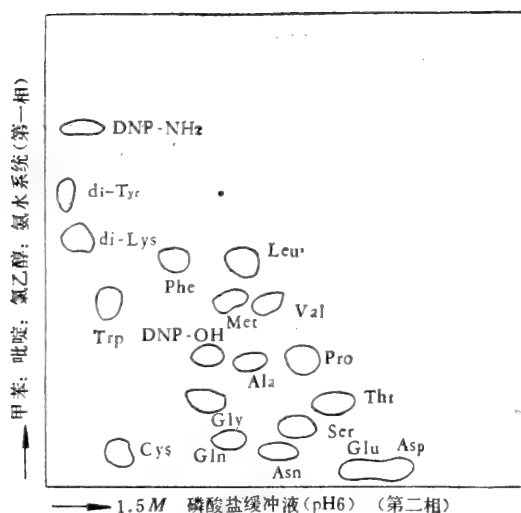


图 3.8 DNP-氨基酸标准图谱

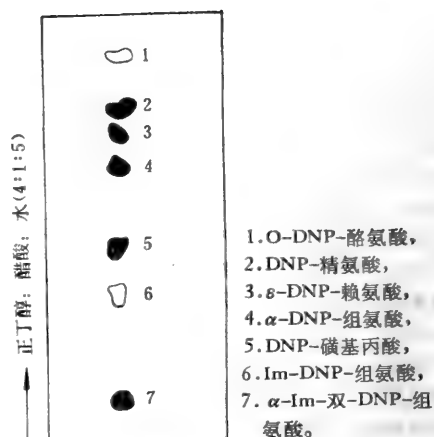


图 3.9 非醚溶性 DNP-氨基酸层析图谱

除有可能的末端 DNP-精氨酸、双-DNP-组氨酸及 DNP-磺基丙酸外还有自由氨基酸、 ϵ -DNP-氨基酸、Im-DNP-组氨酸(无色)、O-DNP-酪氨酸(无色)和 α -DNP-组氨酸。有时 ϵ -DNP-赖氨酸含量很多,影响 DNP-磺基丙酸的鉴定,可先将 H^+ 型磺基丙酸型阳离子交换树脂(相当于 Dowex)与浓缩后的水溶液振摇 30 分钟,把 ϵ -DNP-赖氨酸吸掉,再用层析来鉴定 DNP-磺基丙酸的有无。

讨论

胍解时间随蛋白质种类不同而有差异。非催化胍解时,一般是 10 小时,但有些蛋白质,如核糖核酸酶,原肌球蛋白需要 24 小时。树脂催化胍解时,溶菌酶 20 小时,核糖核酸酶 95 小时,肌红蛋白 88 小时,细胞色素 c16 小时, TMV 蛋白 46 小时。对于未知样品,其胍解时间需要摸索。

参 考 资 料

- [1] Needleman, S. B., Protein sequence determination, (1975), Springer-Verberg Berlin. Heidelberg. New York.
- [2] 潘家秀等, 蛋白质化学研究技术, (1962), 科学出版社。
- [3] 中国科学院上海生物化学研究所, 上海市生物化学学会 1978 年年会论文摘要, 46 页, 55 页, (1978)。
- [4] Lee, K. S. et al., In. *J. Biochem.*, **9**, 457, (1978)。
- [5] Acher, R. et al., *Biochem. Biophys. Acta*, **9**, 704, (1952)。
- [6] Toennies, G. et al., *Anal. Chem.*, **23**, 823, (1951)。
- [7] Patton, A. R. et al., *Science*, **109**, 339, (1949)。
- [8] Hrabětora, E. et al., *J. Chromatog.*, **3**, 199, (1960)。
- [9] Jepson, J. B. et al., *Nature*, **172**, 1100, (1953)。
- [10] Graham, C. E. et al., *J. Biol. Chem.*, **168**, 711, (1947)。
- [11] Stahl, E. et al., *Z. Physiol. Chem., Hoppe-Seyler's*, **323**, 182, (1961)。
- [12] Acher, R. et al., *Biochem. Biophys. Acta*, **9**, 704, (1952)。
- [13] Fraenkel-Conrat, H. et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**, 296, (1956)。
- [14] Dévényi, T. et al., *Amino Acids, Peptides and Proteins*, **56**, (1974), Amstam-London New York.
- [15] 中国科学院上海生物化学研究所四室, 生物化学与生物物理进展, **3**, 19, (1976)。
- [16] Spies, J. R., *J. Biol. Chem.*, **195**, 62, (1952)。
- [17] 蔡祝辉等, 生物化学与生物物理学报, **11**(1), 51, (1979)。

- [18] Sörensen, S. P. L., *Biochem. Z.*, **7**, 45, (1907).
- [19] 陈执中, 非水溶液滴定法及其应用, 35 页, (1966), 科学出版社。
- [20] Van Slyke, D. D., *J. Biol. Chem.*, **83**, 425, (1929).
- [21] 日本化学会编, 实验化学讲座, **23**, 143—146, (1957). 丸善株式会社。
- [22] Patchornik, A., *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 4747, (1958).
- [23] Bloxam, D. L. et al., *Anal. Biochem.*, **60**, 621, (1974).
- [24] 李禄先等, 生物化学与生物物理学报, **5**, 142, (1965).
- [25] McCaman, M. W. et al., *J. Lab. & Clin. Med.*, **59**, 885, (1962).
- [26] Robins, E., *Methods of Biochemical Analysis*, **17**, 287, (1969).
- [27] Elliott, R. J. et al., *Anal. Biochem.*, **70**, 268, (1976).
- [28] 陈志民等, 生物化学与生物物理学报, **1**, 137, (1961).
- [29] Kortt, A. A. et al., *Biochemistry*, **12**, 320, (1973).
- [30] Chibnall, A. C. et al., *Biochem. J.*, **37**, 351, (1943).
- [31] Jacob, S. et al., *Methods of Biochemical Analysis*, **13**, 241, (1965).
- [32] Lowry, O. H. et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 235, (1951).
- [33] Bensadoun, A. et al., *Anal. Biochem.*, **70**, 241, (1976).
- [34] Schaeterbe, G. R. et al., *Anal. Biochem.*, **51**, 654, (1973).
- [35] Jacob, S., *Nature*, **183**, 262, (1958).
- [36] Levin, R. et al., *J. Lab. Clin. Med.*, **38**, 474, (1951).
- [37] Itzhak, R. F. et al., *Anal. Biochem.*, **9**, 401, (1964).
- [38] Warburg, O. et al., *Biochem. Z.*, **310**, 384, (1941); 303, 40, (1939).
- [39] Layne, E. *Methods in Enzymology*, **3**, 450, (1957).
- [40] Kirschenbaum, D. M., *Int. J. Protein Research*, **3**, 109, 157, 237, 329, (1972); **4**, 63, 125, (1973); **5**, 49, (1973); *Anal. Biochem.*, **55**, 166, (1973); **56**, 237, (1973); **64**, 186, (1975); **68**, 465, (1975); **80**, 193, (1977); **81**, 222, (1977).
- [41] Murrphy, J. B. et al., *Biochem. Biophys. Acta*, **45**, 382, (1960).
- [43] McKnight, G. S., *Anal. Biochem*, **78**, 86, (19 27, 168, (1958).
- [43] McKnight, G. S., *Anal. Biochem*, **78**, 86, (1977).
- [44] Gray, W. R., *Methods in Enzymology*, **11**, 139, (1967).
- [45] Braum, V. et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **118**, 241, (1967).

第四章 核 酸 类

袁厚积 蔡武城 赵志安

核酸是构成生物体最主要的组成成分之一,是遗传信息的载体,和蛋白质的生物合成密切相关,因此核酸在生物的遗传变异、生长繁殖和分化发育等方面都起着决定性的作用。核酸的研究对于肿瘤的发生和治疗也有重要的意义。目前核酸的研究已成为生物化学和分子生物学中的一个重要内容。

无论从事核酸哪一方面的研究工作,核酸类物质的定量测定都是一种基本手段。各种分析测定的方法都以核酸类物质的特性为依据。核酸是由磷酸、戊糖、碱基所组成的核苷酸的多聚高分子。根据所含戊糖的种类,核酸可以分为核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)两大类。核酸分子内含有磷,一般 RNA 中含磷为 8.5—9.0%,DNA 中含磷为 9.2%,因此可用定磷法来测定核酸的含量。RNA 中含有核糖,DNA 中含有脱氧核糖,它们各有特殊的颜色反应,因此可用定糖法来测定核酸的含量。DNA 和 RNA 所含碱基都具有共轭双键的杂环结构,对紫外线有特异的吸收作用,因此根据对紫外线吸收的强弱不但可以测定核酸的含量,还可利用不同波长光吸收的比值来判断核苷酸的种类。此外结合层析、电泳等技术还可以测定核酸中碱基的比例,酶解核酸片段的分离。

本章介绍核酸中常用的化学测定方法。着重于核酸的定量测定和核酸水解产物的分离鉴定,辅以核酸的分离提取和核酸的水解。

第一节 核酸的分离提取

核酸的提取是研究核酸的结构、功能及其理化性质的前提。核酸是具有生物活性的高分子聚合物,它的生物活性很易在制备过程中受到破坏。为了分离得到高度聚合状态天然核酸,在分离提取时必须采用温和的条件,避免过碱过酸,避免剧烈的长期搅拌和切割,防止热变性及核酸降解酶类的作用等。一般还常用柠檬酸钠,乙二胺四乙酸抑制 DNA 酶,用皂土抑制 RNA 酶。如果应用十二烷基磺酸钠或苯酚法作为核蛋白的解聚剂与蛋白质的变性剂来分离核酸,与此同时这类物质也能抑制核酸降解酶类,因此常能取得较好的效果。

核酸的提取方法较多,目的不同可采用不同的方法。如为了得到有生物活性的高聚程度的核酸,一般用 SDS 法、酚法或氯仿-异戊醇法去蛋白质,如所得的核酸是用来制造医药或药品工业核苷酸类药物,那么制品有些降解与变性也不成问题,可用浓盐法。另外,生物材料的不同所采用的方法也异。

由于方法不同,或即使用同一方法但由于具体条件及操作步骤的不同,往往所得制品的生物活性、理化性质、含量与纯度也会有差异,这也是各实验室所推导数据不一致的原因。

核酸制品的标准问题较为复杂。确定核酸的含量与纯度可应用紫外吸收法和化学方法。确定核酸的聚合程度可用测定沉降常数、粘度和分子量物理化学方法。但要确定天然状态程度,最好是测定它的生物活性。

一、DNA 的提取

(一) 小牛胸腺 DNA 的提取^[1]

原理

小牛胸腺和鱼类精子中含有较多的 DNA, 是提取 DNA 的良好材料。脱氧核糖核蛋白和核糖核蛋白的分离主要利用它们在 0.14M NaCl 溶液中溶解度的显著不同。脱氧核糖核蛋白在 0.14M NaCl 溶液中溶解度很低, 只及它在纯水中的溶解度 1%, 而在 1M NaCl 溶液中, 它的溶解度至少是在水中的二倍。相反核糖核蛋白能在 0.14M NaCl 中溶解。利用这一点, 可以使脱氧核糖核蛋白与核糖核蛋白分开。

试剂

1. SSC 液 含 0.15M NaCl 和 0.015M 柠檬酸三钠的溶液, pH7.0。
2. 0.1 SSC 液 取 SSC 液用蒸馏水稀释十倍即成。
3. 10 SSC 液 含 1.5M NaCl 和 0.15M 柠檬酸三钠的溶液。
4. 10% 十二烷基磺酸钠 (SDS) (用 45% 乙醇配制)
5. 氯仿-异戊醇混合液 (24:1V/V)
6. 0.15M NaCl—0.1M 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA), pH8
7. NaCl(C.P.)
8. 70%, 95% 乙醇

操作步骤

1. 小牛胸腺的净化 将小牛胸腺浸于预先冷却的 0.15M NaCl 和 0.015M 柠檬酸三钠混合液(简称 SSC 液)中, 去杂质, 脂肪, 血块等, 再用 SSC 液反复洗涤数次至无血色为止。

2. 匀浆、去除核糖核酸核蛋白 向洗净的胸腺加五倍重量 SSC 溶液, 用玻璃匀浆器匀浆, 直到大部分细胞破碎后倒入预冷的离心杯中以 4000 转/分离心十分钟, 弃去上清液(含核糖核酸核蛋白), 沉淀物(含脱氧核糖核酸核蛋白)再加二倍体积的 SSC 液, 搅匀, 离心。如此重复二次。

3. 解离脱氧核糖核酸核蛋白 将沉淀悬于五倍体积 pH8 的 0.15M NaCl—0.1M 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA 钠盐) 溶液中, 在搅拌的同时慢慢滴加 10% 十二烷基磺酸钠至最终浓度为 1%, 随后加入固体 NaCl 使其最后浓度达到 1M, 继续搅拌 30—60 分钟, 使 NaCl 全部溶解。

4. 去蛋白质与沉淀 DNA 向上述溶液加入等体积氯仿异戊醇 (24:1 V/V) 激烈振荡 20 分钟, 4000 转/分离心 30 分钟, 取上层水相加二倍体积预冷的 95% 乙醇, 用玻棒缠绕 DNA 纤维, 挤干, 用 70% 乙醇洗二次, 再用 95% 乙醇洗一次, 溶于 0.1 SSC 液中,

用氯仿-异戊醇重复去蛋白质数次,直到中间蛋白质层极少或消失为止,上层水相用 95% 乙醇沉淀,捞取的 DNA 白色纤维,取出挤干,溶于 0.1 SSC 液中,溶解后再加 10 SSC 液,使 SSC 液的最终浓度达到 1 SSC,放于冰箱中保存备用。

5. 含量及纯度测定 详见定磷法,紫外吸收法,定糖法测定含量,用福林酚试剂法测此 DNA 制品中蛋白质的含量,来鉴别所得 DNA 的纯度,并计算每克胸腺中 DNA 的含量。

(二) 微生物 DNA 的提取^[2]

原理

为了研究微生物中遗传物质 DNA 的生物、化学和物理特性,必须分离得到具有高度聚合状态天然 DNA。

由于细菌具有坚韧的细胞壁,有的细菌对十二烷基磺酸钠(SDS)有抗性,因此可先用溶菌酶溶解细胞壁,然后再用 SDS 处理,使菌体进一步溶解而释放出核酸与蛋白质。另外 SDS 具有抑制脱氧核糖核酸酶的作用并使部分蛋白质变性。溶菌后所得的高粘度悬液在 pH8.2 的水饱和酚的作用下,可以使 DNA 活性不丧失而蛋白质变性,离心去除变性蛋白质。但必须注意细菌细胞中含有大量的 RNA,如要得到较纯的 DNA 可用核糖核酸酶处理,使 RNA 降解而除去,也可用异丙醇选择性的沉淀 DNA,而 RNA 留在溶液中,最后用 95% 乙醇作沉淀剂而得白色纤维状的 DNA。

试剂

(1) 0.15M 氯化钠-0.1M 乙二胺四乙酸二钠溶液, pH8.0。8.76 克氯化钠,37.2 克乙二胺四乙酸二钠加 800 毫升蒸馏水,并以 NaOH 调至 pH8.0,定容到 1000 毫升。

(2) Tris-SDS 缓冲液: pH9.0 0.1M Tris 缓冲液中含有 1% SDS 和 1M 氯化钠。

(3) 水饱和酚: 新鲜重蒸酚用水饱和后以 5N NaOH 调至 pH8.2。

(4) SSC 溶液: 含 0.15M 氯化钠和 0.015M 柠檬酸三钠的溶液, pH7.0。

(5) 0.1 × SSC 溶液: 取 SSC 溶液用蒸馏水稀释十倍即成。

(6) 10 SSC 溶液: 含 1.5M 氯化钠和 0.15M 柠檬酸三钠的溶液。

(7) 结晶溶菌酶: (生化试剂,活力 10,000 至 20,000 单位),以氯化钠-乙二胺四乙酸二钠 (pH8.0) 溶液配成每毫升 2 毫克的酶液。

(8) 结晶牛胰核糖核酸酶 (RNase, 生化试剂),以 0.1M 氯化钠-0.01M pH5.4 醋酸盐缓冲液配成每毫升 2 毫克的酶液,使用前此酶先在 80℃ 水浴中加热 10 分钟进行预处理,使污染的脱氧核糖核酸酶失活。

(9) 干冰、粗盐、95% 乙醇、70% 乙醇。

操作步骤

1. 枯草杆菌 (*B. Subtilis*) 的培养 20 只 250 毫升三角烧瓶内分别装放 30 毫升肉汤培养基,15 磅灭菌 15 分钟,冷却后接种,37℃ 摇床上培养 12—15 小时。

2. 菌体收集及洗涤 将枯草杆菌培养液合并在冰水浴中预冷,3000 转/分离心 20 分钟,弃去上清液,以预冷的 25 毫升氯化钠-乙二胺四乙酸二钠 (pH8.0) 溶液洗涤菌体,

经 3000 转/分离心 20 分钟,弃去上清液。

以少量氯化钠-乙二胺四乙酸二钠 (pH8.0) 溶液将菌体完全转移到已称重的刻度离心管中, 3000 转/分离心 20 分钟,小心吸去上清液后称重,计算出湿菌体重量。

3. 溶菌 加入与湿菌体同体积的每毫升 2 毫克的溶菌酶溶液,搅匀后在 37℃ 水浴中保温 10—20 分钟,当菌液开始发粘时取出,倒于 50 毫升烧杯中,立即将烧杯放入干冰浴中冷冻。按 1 克湿菌体加 8 毫升 Tris—SDS 缓冲液的比例把缓冲液加入到已冷冻的细胞中,用玻棒捣碎,使成悬浮液。在 60℃ 水浴中使此悬浮液温热到完全融化。溶菌完成后得到粘稠状溶液。

4. 酚去蛋白质 已溶菌的悬浮液置于磨口塞细口瓶中,加入等体积的水饱和酚,在 4℃ 下手摇 20 分钟,得到乳浊液于 3000 转/分离心 15 分钟,离心后分三层,上层液相含有 DNA,中间为变性蛋白层,下层为酚层。小心吸出上层液相,量其体积,再加等体积的水饱和酚抽提去蛋白质。如此反复三到四次直至中间蛋白质层极少或消失为止。小心吸出上层水相,并量其体积。

5. 核糖核酸酶去 RNA 加每毫升为 2 毫克的经预处理过的核糖核酸酶溶液到含有 DNA 的上层水相中,使此酶的最终浓度为每毫升 50 微克,混合液在 37℃ 下保温 30 分钟,冷却后再加等体积的水饱和酚,4℃ 下摇动 10 分钟,离心后,收集含有 DNA 的上层水相,量其体积。

6. DNA 的沉淀 加 2 倍于 DNA 溶液体积的预冷 95% 乙醇,即有白色纤维状的 DNA 沉淀析出,以玻棒缓慢转动,白色纤维状的 DNA 即缠绕于玻棒上。

DNA 沉淀分别在 70%, 95% 乙醇中洗涤后,压干,将此 DNA 放入试管内,加 4 毫升 0.1 SSC 溶液,待 DNA 溶解后补加 0.4 毫升 10 SSC 溶液,使 DNA 成 1 SSC 溶液。

7. 含量测定 详见紫外法及定磷法测核酸含量,改良二苯胺法测 DNA 量,福林酚法测蛋白质量。

计算出每克湿菌体中 DNA 的含量及 DNA 制品中蛋白质的含量。

二、RNA 的提取^[3]

(一) 肝脏 RNA 的提取

原理

在低温下把组织匀浆,利用核糖核蛋白在 0.14M NaCl 溶液中较易溶解的特性,使与脱氧核糖核蛋白分开,再用蛋白质变性剂去除蛋白质,使 RNA 释放出来,用乙醇沉淀即得 RNA 的沉淀物。

试剂

(1) SSC 溶液: 含 0.15M 氯化钠和 0.015M 柠檬酸三钠的溶液, pH7.0。

(2) 5% 十二烷基磺酸钠 (SDS) (溶于 45% 乙醇中)。

(3) 水饱和酚,新鲜重蒸酚用水饱和。

(4) 95% 乙醇-2% 醋酸钾。

(5) 95% 乙醇。

(6) 冰浴、粗盐。

操作步骤

1. 取大白鼠肝脏 将大白鼠饥饿过夜,打空气针于心脏,迅速死亡,取出肝脏,放入搁于冰上的小烧杯中,称重记录之。

2. 匀浆 用冷的 SSC 液洗去血水,倾去洗涤液,用不锈钢剪刀将肝剪成碎块,加 SSC 液(按肝重计每克新鲜肝加 2 毫升 SSC 液)倒入玻璃匀浆器磨研 10 分钟。

3. 分离 RNA-核蛋白 倒出匀浆用纱布过滤,滤液经 3000 转/分离心 20 分钟,离心后分二层:上层为 RNA-核蛋白,下层为细胞核及细胞碎片。

4. 解聚 RNA-核蛋白 将上层液小心倾出,量其体积,加入 5% SDS 溶液,使其最终浓度为 0.5% 左右,室温摇匀。

5. 酚去蛋白质 向上述溶液加等体积预热到 65℃ 的水饱和酚,摇匀后置于 65℃ 水浴中摇动 10 分钟,再移到冰浴中摇荡 10 分钟,经 3000 转/分离心 15 分钟,离心后分三层:上层水相含 RNA,中层为变性蛋白质与少量 RNA,下层为酚层。小心吸出水相再加等体积的水饱和酚抽提去蛋白质,如此重复 2—3 次,直到中层有极少或无变性蛋白质出现。吸出上层水相加 2.5 倍体积预冷的 95% 乙醇—2% 醋酸钾沉淀 RNA,离心收集 RNA,溶于 SSC 溶液中,再用 95% 乙醇沉淀一次,沉淀的 RNA 再溶于 SSC 溶液中,贮于冰箱中备用。

6. 含量及纯度测定 详见后面紫外法和定磷法,利用苔黑酚法测 RNA 的量,福林酚试剂法测 RNA 制品中蛋白质含量,计算每克新鲜肝脏 RNA 的含量及 RNA 制品中蛋白质的百分数。

(二) 酵母 RNA 的提取^[4]

原理

酵母中 RNA 含量特别多,可占干重 3—10% 左右, DNA 含量很少,约占干重的 0.5% 或者更小,因此多采用酵母来提取 RNA。

提取 RNA 的方法很多,可根据制备目的的不同而采用不同的方法。常用的有稀碱法和浓盐法。稀碱法是用稀碱使细胞壁溶解,操作简单,抽提时间短,但所得产品有不同程度的解聚。浓盐法的依据是酵母在高浓度盐溶液中细胞壁发生破损,经加热 RNA 从细胞质内释放出来,并利用等电点性质把其从溶液中沉淀出来,所得的 RNA 已有部分变性,产品主要作为制备各种核苷酸及核苷的原料。

若要提取接近天然状态的 RNA,可采用苯酚法或氯仿-异戊醇去蛋白质制备 RNA。

试剂

(1) NaCl(C.P.)。

(2) 6N HCl。

(3) 95% 乙醇。

操作步骤

1. 洗涤酵母 取啤酒酵母于 4℃ 下用水洗涤 3—4 次, 3000 转/分离心 10 分钟得酵母泥, 取 20 克酵母泥于培养皿中, 置于 100℃ 烘箱中烘干, 测定其含水量, 一般含水量在 80% 左右。

2. 抽提 一般抽提时控制干酵母量与食盐水之比为 1:10, 盐的最终浓度为 8—10%。称取酵母泥 25 克 (相当于干酵母重 5 克左右) 制成相当于干酵母重 10% 的悬浮液, 加入 20% 的盐水 20 毫升, 搅拌均匀, 放于沸水浴中抽提 2 小时。

3. 分离 将抽提液取出迅速冷却, 分装到离心管内于 3000 转/分离心 30 分钟, 使抽提液与菌体残渣等分离。

4. 沉淀 RNA 离心所得的上清液, 倒入烧杯内, 置于冰浴中冷却 20 分钟, 在搅拌下小心地用 6N HCl 调节 pH 至 2.5, 在冰浴中静置 20 分钟, 使 RNA 沉淀完全, 3000 转/分离心 15 分钟, 得到 RNA 沉淀, 用 70% 乙醇洗 2 次, 90% 乙醇洗 2 次, 干燥, 即得 RNA 制品。

5. 含量测定 用紫外法及定磷法测定此制品中 RNA 的量, 计算每克干酵母中 RNA 的量, 用福林法测蛋白质的含量。

第二节 核酸及其组分的定量测定

一、定磷法

核苷酸和核酸都为含磷的有机化合物, RNA 含磷量为 8.5—9.0%, DNA 为 9.2%, 即核酸重量为磷重量的 11 倍左右, 每测得 1 毫克核酸的磷, 即表示含有 11 毫克左右的核酸, 因此可用定磷法来测定核酸的含量。

用浓硫酸将核酸消化, 使其有机磷氧化成无机磷, 而无机磷与定磷试剂中钼酸铵反应生成的磷钼酸铵, 在一定酸度下遇还原剂时, 其中的高价钼被还原成低价钼, 生成深蓝色的物质钼蓝, 该物质在 660nm 处有最大的吸收值, 在一定的磷浓度范围内, 蓝色的深浅与磷含量成正比。为了求得含磷量与光密度的关系, 必须先用标准无机磷溶液 (KH_2PO_4) 与定磷试剂反应, 作出无机磷含量与光密度关系的标准曲线。

为了消除核酸样品中原有无机磷杂质的影响, 应同时测定核酸样品的无机磷, 并从总磷中减去无机磷, 才能代表核酸中真正所含的磷。

定磷法准确性好, 灵敏度比较高, 最低可以测到每毫升 10 微克核酸的水平, 因此可作紫外吸收法和定糖法的基准方法。

这里介绍酸解脱磷及过碘酸氧化法脱磷二种方法。

(一) 酸解脱磷法

原理

将被测核酸样品与浓硫酸、催化剂一起加热, 有机物便被分解, 此过程称为消化。核酸样品中有机磷被分解并氧化成无机磷酸, 可用钼蓝比色法测定之。核苷酸和大分子核

酸都可用此法脱磷。

此外,嘌呤类核苷酸也可用 $1.5N$ HCl $100^{\circ}C$ 水解 1 小时脱磷; 嘧啶类核苷酸可用 $10N$ H_2SO_4 消化 1—2 小时脱磷。

试剂

1. 标准磷溶液(含磷 5 微克/毫升) 准确称取 KH_2PO_4 (先在 $105^{\circ}C$ 烘箱中烘至恒重) 0.4389 克定容至 100 毫升,即含磷为 1 毫克/毫升作为贮备液,用时再将该液稀释 200 倍,含磷量为 5 微克/毫升。

2. 定磷试剂 $6N$ H_2SO_4 :2.5% 钼酸铵:水:10% 抗坏血酸=1:1:2:1(V/V)

此试剂要按上述次序现配现用,置于棕色瓶中,试剂应为淡黄色或黄绿色,如呈棕黄色或深绿色应弃去。10% 抗坏血酸避光保存于冰箱中可用 1—2 个月,在反应中作还原剂。

操作步骤

1. 标准曲线制作 分别吸取标准磷溶液(5 微克/毫升) 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 毫升,加定磷试剂 3 毫升, $45^{\circ}C$ 保温 20 分钟,测 OD_{660} 值。

以含磷量(微克)作横坐标, OD_{660} 值为纵坐标,制作标准曲线,求出标准曲线常数 K 值($OD = 1.0$ 时的含磷微克数)。 K 值因仪器,测定条件及试剂的不同而异,故样品与标准曲线应该用同一批试剂,同一台仪器及相同测定条件。

2. 样品总磷量测定

(1) 消化: 取 1 毫升被测样品溶液(也可取固体样品)约含 2.5—5 毫克核酸,置于消化管中,加入 1 毫升 $36N$ 浓硫酸及约 50 毫克催化剂($CuSO_4 \cdot 5H_2O$: $K_2SO_4 = 1:4W/W$),在消化炉上小火加热至发生白烟,样品由黑变成淡黄色,取下稍冷,小心地滴加 2 滴 30% 过氧化氢溶液促进其氧化,继续加热至溶液呈无色或浅蓝色为止、稍冷,加 1 毫升水,在 $100^{\circ}C$ 加热 10 分钟以分解消化过程中形成的焦磷酸,冷却至室温(空白对照不加样品同样消化)。消化液和空白对照都用蒸馏水定容至 50 毫升,使溶液达到一定酸度。

(2) 显色测定: 取试管二支,一支加入 1 毫升稀释的消化液,蒸馏水 2 毫升;另一支加入空白对照的稀释液 1 毫升,蒸馏水 2 毫升。各加定磷试剂 3 毫升,摇匀,在 $45^{\circ}C$ 保温 20 分钟,测 OD_{660} 值。

(3) 样品中无机磷含量的测定: 取上述未经消化的样品溶液 1 毫升或固体样品(含 2.5—5 毫克核酸)定容至 50 毫升,取 1 毫升加蒸馏水 2 毫升,加定磷试剂 3 毫升,在 $45^{\circ}C$ 保留 20 分钟,测 OD_{660} 空白以水代样品。

样品中核酸(或核苷酸)含量 %

$$= \frac{(OD_{660} \text{ 总磷} - OD_{660} \text{ 无机磷}) \times K \times D \times 11}{C \times 10^3} \times 100\%$$

K : 标准曲线常数

D : 稀释倍数 即 $\frac{\text{消化后定容毫升数}}{\text{消化时取样毫升数}}$ 的数值,若样品是固体,则 $D = \text{消化后定容的毫升}$

数

V: 比显色测定时取样毫升数

C: 样品浓度(毫克/毫升),若样品是固体,则 **C** 为样品重量(毫克)

计算示例: 测定某厂生产 RNA 制品的含量,取 5 毫克样品按上述步骤操作,求得 $K = 17.5$, 总磷 $OD_{660} = 0.390$, 无机磷 $OD_{660} = 0.004$

$$\text{则样品 RNA 含量\% (纯度)} = \frac{\frac{(0.390 - 0.004) \times 17.5 \times 50 \times 11}{1} \times 100\%}{5 \times 10^3} = 75.8\%$$

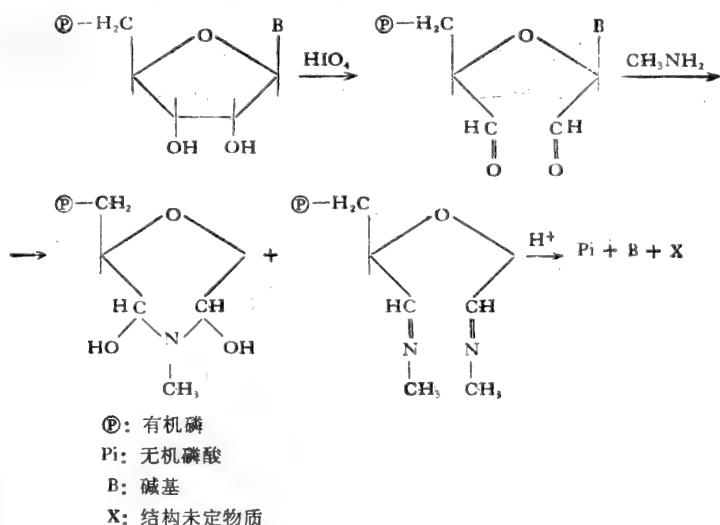
注: 若样品浓度较稀或量较少,则可增加消化时的取样量和比色测定时的取样量。

(二) 过碘酸氧化脱磷法

原理

5'-核糖核苷酸的 2', 3' 位上有二个顺式自由羟基, 用过碘酸氧化断裂成双醛化合物后, 可与甲胺生成加成物, 该加成物在酸性条件下定量地脱去 5'-磷酸, 加入定磷试剂后, 此磷酸与定磷试剂反应生成钼蓝物质, 可进行比色测定。此法只可测 5'-核糖核苷酸, 可测得样品核苷酸溶液最低浓度为 10 微克/毫升。

反应式如下:



试剂

1. 6% 过碘酸试剂 3 克过碘酸钠 $\text{Na}_3\text{H}_2\text{IO}_6$ (或 2.1 克 NaIO_4) 加 5 毫升 6N H_2SO_4 , 加蒸馏水至 50 毫升, 贮于棕色瓶中。
2. 30% 乙二醇 97% 乙二醇 155 毫升, 加蒸馏水至 500 毫升。
3. 2M 甲胺 30% 甲胺 50 毫升, 加蒸馏水至 250 毫升。

操作步骤

1. 标准曲线制作 用 KH_2PO_4 配成 5 微克/毫升的标准磷溶液, 吸取 0、0.5、1.0、

1.5、2.0 毫升,补水到 2 毫升,加 6% 过碘酸试剂 0.1 毫升,摇匀,室温反应 1 分钟左右,加 30% 乙二醇 0.4 毫升(以破坏剩余过碘酸),2M 甲胺 0.5 毫升,45℃ 保温 10 分钟。加定磷试剂 3 毫升,45℃ 保温 20 分钟,冷至室温后测 OD_{660} 。以 OD_{660} 为纵坐标,含磷量(微克)为横坐标,制作标准曲线。求出标准曲线常数 K 值(即 $OD = 1.0$ 时的含磷微克数)。

2. 总磷及无机磷的测定 将样品配成 20~60 微克/毫升核苷酸浓度,取 2 毫升,按上述剂量和操作依次加入过碘酸→乙二醇→甲胺→定磷试剂,反应后测得的为总磷 OD_{660} 值。空白以水代样品。

加样次序换成过碘酸→乙二醇→样品液→水→甲胺→定磷试剂,剂量和操作不变,则测得的为无机磷 OD_{660} 值。(先加乙二醇后加样品则使过碘酸预先被乙二醇完全破坏,不能再氧化样品)、空白以水代样品。

5'-核苷酸量(毫克/毫升)

$$= \frac{(\text{OD}_{660} \text{ 总磷} - \text{OD}_{660} \text{ 无机磷}) \times K \times D \times M \times 10^{-3}}{V}$$

31*

K : 标准曲线常数 ($OD = 1.0$ 时的含磷微克数)

D : 样品稀释倍数

M : 被测核苷酸分子量,或四种核苷酸的平均分子量 340

V : 测定时取样毫升数

计算示例: 测定 RNA 经 5'-磷酸二酯酶降解后溶液中 5'-核苷酸含量。

按上述步骤操作,测得 $K = 20.84$, 酶解液稀释 100 倍后测定得总磷 $OD_{660} = 0.460$, 无机磷 $OD_{660} = 0.028$

则 5'-核苷酸量 = $\frac{(0.460 - 0.028) \times 20.84 \times 100 \times 340 \times 10^{-3}}{1 \times 31} = 9.87$ (毫克/毫升)

二、定糖法

RNA 含有核糖, DNA 含有脱氧核糖,二种糖有不同的颜色反应,经过显色后,所呈现的颜色深浅在一定范围内与样品所含的糖量成正比。由于常用的测糖法只能测定 RNA 和 DNA 中与嘌呤连接的糖,而不同来源的核酸含嘌呤,嘧啶的比例各不相同(除双链 DNA 中嘌呤克分子数=嘧啶克分子数),故把测得的糖量来统一换算出核酸的含量是不很正确的,现在一般用与被测核酸同一来源的纯化核酸作核酸含量~ OD 标准曲线,通过标准曲线查出被测核酸的含量。

定糖法多用于大分子核酸的测定,此法准确性、灵敏度较差,干扰物质甚多,其优点是可以检别 RNA, DNA。

(一) RNA 的定量测定

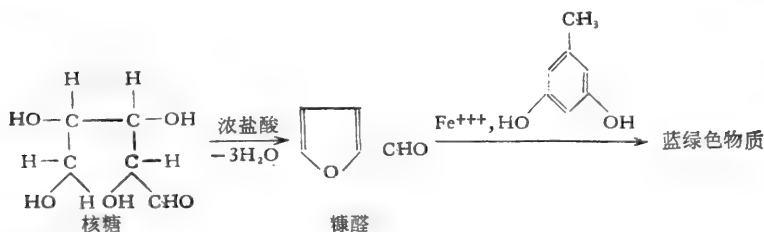
1. 苔黑酚法^[5, 6]

* 磷的原子量

原理

RNA 酸解后生成嘧啶核苷酸、嘌呤碱基及核糖。核糖在浓酸中脱水环化生成糠醛，它与苔黑酚(3, 5-二羟甲苯)作用显示蓝绿色, 在 670 毫微米有最大吸收值。待测样品最适浓度在每毫升含 15—100 微克 RNA 之间, 光密度的读数与 RNA 的浓度成线性关系。样品中 DNA 含量多时干扰测定, 蛋白质、粘多糖对测定有干扰。

反应式如下:



试剂

苔黑酚试剂: 20 克苔黑酚(又名地衣酚)(市售产品若贮藏过久已被氧化成红色, 则需用热苯重结晶后使用), 硫酸铁铵(也可用三氯化铁代之) 13.5 克, 用蒸馏水配成 500 毫升, 是为储备液。低温保存, 临用时取贮备液 2.5 毫升, 加 12N HCl 41.5 毫升, 再加蒸馏水到 50 毫升摇匀, 即为苔黑酚应用液。

操作步骤

(1) 标准曲线制作: 取与被测物同来源的商品 RNA, 用定磷法测定纯度后, 按纯核酸的含量配成 100 微克/毫升的溶液, 分别吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 毫升, 补水到 1 毫升, 加苔黑酚应用液 3 毫升, 置沸水浴加热 20 分钟, 立即用冷水冷却, 测 OD_{670} 。以 OD 值为纵坐标, 纯 RNA 量(微克)为横坐标, 制作标准曲线。

(2) 样品中 RNA 测定: 需与标准曲线制作用同一批试剂、同一台比色剂。将样品配成约含 RNA 40—100 微克/毫升浓度, 吸取 1 毫升, 加苔黑酚应用液 3 毫升, 同上条件测得 OD_{670} , 空白以水代样品。从标准曲线查出 RNA 量, 再根据稀释倍数计算出样品的 RNA 含量。

计算示例: 某 RNA 制品 1 克定容至 100 毫升, 用 5% 氨水调 pH7 (助溶) 取 1 毫升稀释至 100 毫升, 得 100 微克/毫升溶液, 用上法测得 $OD_{670} = 0.650$ 查标准曲线得 RNA 为 80 微克。故样品中 RNA 含量为

$$\frac{80 \times 100 \times 100}{1.00 \times 10^6} \times 100\% = 80.0\%$$

2. 改良苔黑酚法^[7]

原理

与苔黑酚法相同, 但此法用铜离子代替铁离子催化, 使反应灵敏度提高一倍以上, 待测样品浓度在每毫升含 5—50 微克 RNA 之间, 光密度读数与 RNA 浓度成线性关系。

试剂

- (1) 苔黑酚溶液: 5 克苔黑酚加 10 毫升 95% 乙醇作为贮备液。
- (2) 铜离子溶液: 0.75 克 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 500 毫升 12N HCl, 呈深黄色。
- (3) 苔黑酚-铜离子试剂: 使用前 2 毫升苔黑酚溶液加 100 毫升铜离子溶液混匀。
- (4) RNA 标准溶液: 每毫升含 50 微克 RNA, 用 0.001N NaOH 配制。

操作步骤

(1) 标准曲线的制作: 分别吸取每毫升为 50 微克 RNA 的标准溶液 0、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 毫升至各个测定管中, 每管补水至 2 毫升, 向各管加苔黑酚-铜离子试剂 2 毫升, 充分摇匀, 测定管上放玻璃球于 100℃ 保温 35 分钟, 流动水冷却后, 测 OD_{670} 值。以 OD 值为纵坐标 RNA 量(微克)为横坐标, 作出标准曲线。

(2) 样品中 RNA 含量的测定: 样品用 0.001N NaOH 配成每毫升为 20—50 微克浓度, 吸取 2 毫升, 加苔黑酚-铜离子试剂 2 毫升, 充分摇匀, 以后同标准曲线制作步骤一样操作。从标准曲线查出样品中 RNA 量, 再根据稀释倍数算出样品中 RNA 含量, 样品测定与制作标准曲线必须用同一批试剂使用同一台分光光度计。

计算示例: 某 RNA 制品 10 毫克定容于 250 毫升 0.001N NaOH 溶液中。

取 2 毫升用上法测得 $\text{OD}_{670} = 0.450$ 查标准曲线得 RNA 量为 67 微克, 故样品中 RNA 含量为:

$$\frac{67 \text{ 微克} \times 250 \text{ 毫升}}{2 \text{ 毫升}} \div \frac{10 \text{ 毫克} \times 10^3}{10^3} \times 100\% = 83.75\%$$

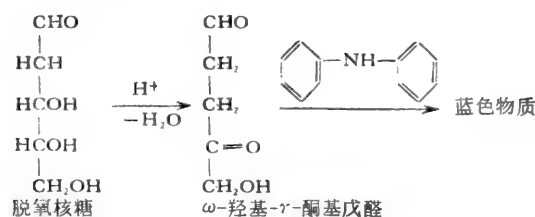
(二) DNA 的定量测定

1. 二苯胺法^[8]

原理

DNA 酸解后生成嘧啶核苷酸、嘌呤、磷酸及脱氧核糖。脱氧核糖在酸性条件下脱水生成 ω -羟基- γ -酮基戊醛。后者与二苯胺作用显示蓝色, 在 600 毫微米有最大吸收值, 待测样品浓度在每毫升含 50—500 微克 DNA 之间, 光密度的读数与 DNA 的浓度成线性关系。样品中若含有一定量的 RNA 对测定影响不大, 盐类对测定有影响, 蛋白质、多糖类及其衍生物、芳香醛、羟基醛与二苯胺形成各种有色物质, 干扰测定。

反应式:



试剂

二苯胺试剂：市售二苯胺不纯，可用 75% 乙醇重结晶 1—2 次。将 1 克二苯胺溶于 98 毫升冰醋酸中，加 2 毫升 36N 硫酸，冰箱保存，当天使用。

操作步骤

(1) 标准曲线制作：取与被测样品相同来源的 DNA 纯化制品，用定磷法测定纯度、按纯 DNA 含量配成 500 微克/毫升溶液。吸取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 毫升，补水到 1.0 毫升，再加二苯胺试剂 2.5 毫升，置沸水浴 10 分钟，冷水冷却后测 OD_{660} 。以 OD_{660} 为纵坐标，纯 DNA 量(微克)为横坐标，画出标准曲线。

(2) 样品中 DNA 测定：样品配成 100—400 微克/毫升浓度。吸取 1 毫升，加二苯胺 2.5 毫升，同上操作，空白以水代样品。从标准曲线查出 DNA 量，再根据稀释倍数算出样品中 DNA 含量。测定时需与制作标准曲线时用同一批试剂，同一台分光光度计。

2. 改良二苯胺法^[9]

原理

同二苯胺法。用乙酸戊酯把反应中形成的蓝色产物抽提到有机溶剂相进行浓缩，灵敏度有所提高。

所得反应的产物同样在 600 毫微米有最大吸收值。待测样品浓度在每毫升 10—70 微克 DNA 范围内光密度的读数与 DNA 的浓度成线性关系。

试剂

(1) 4% 二苯胺冰醋酸溶液：4 克重结晶二苯胺加少量冰醋酸微热溶解后，加冰醋酸至 100 毫升，当天使用。

(2) 20% 过氯酸：71.4 毫升 70% 过氯酸(A.R.)加水至 250 毫升。

(3) DNA 标准溶液：配成每毫升 100 微克浓度(DNA 在水内较难溶，需隔夜配制)。

(4) 乙酸戊酯(C.P.)

操作步骤

(1) 标准曲线的制作

分别吸取每毫升为 100 微克 DNA 的标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 毫升至各个测定管中，每管加水至 2 毫升，再加 2 毫升 20% 过氯酸，4 毫升 4% 二苯胺，充分摇匀，在 56℃ 保温一小时，流动水冷却，每管加 2 毫升乙酸戊酯，剧烈摇动混匀，静止放置 5—10 分钟或以每分钟 3000 转的速度离心一分钟，使混合液分成有机相和水相二层，测定有机相的 OD_{600} 值(用 0.5 厘米光径比色杯)。以 OD_{600} 为纵坐标，DNA 量(微克)为横坐标，画出标准曲线。

(2) 样品中 DNA 含量的测定：样品用水配成每毫升 20—60 微克浓度，吸取 2 毫升加 2 毫升 20% 过氯酸，4 毫升 4% 二苯胺，充分摇匀，以后同标准曲线制作步骤一样操

作,空白以水代 DNA。从标准曲线查出样品中 DNA 量,再根据稀释倍数算出样品中 DNA 含量。测定时须与制作标准曲线同用一批试剂同一台分光光度计。

3. 吡啶法^[10]

原理

DNA 酸解后生成嘧啶核苷酸,嘌呤、磷酸及脱氧核糖。后者与吡啶反应生成黄棕色,用氯仿抽提除去干扰物质,在 OD_{490} 有最大吸收值。待测样品浓度每毫升含 5—25 微克 DNA 之间,光密度读数与 DNA 浓度成线性关系。

此反应与二苯胺法一样,仅与脱氧核糖核酸中的嘌呤核苷酸有关。文献中以 2% 过氯酸作为 DNA 溶剂,但 DNA 在过氯酸中难溶,而用 0.1 SSC 液代替过氯酸溶解 DNA,对测定没有影响,吡啶的浓度用 0.04% 或 0.08% 都可。

试剂

(1) 0.08% 吡啶水溶液:称取 0.8 克吡啶加少量 95% 乙醇溶解后,加水至 100 毫升(吡啶直接加水配制不能溶解)。

(2) DNA 标准溶液:每毫升含 DNA 25 微克、用 0.1SSC 液配制。

(3) 12N HCl。

(4) 氯仿(A.R.)。

(5) SSC 液:含 0.15M NaCl 及 0.015M 柠檬酸钠溶液。此液用水稀释 10 倍即为 0.1SSC 液。

操作步骤

(1) 标准曲线的制作:分别吸取 1 毫升 0.08% 吡啶溶液和 1 毫升 12N HCl 至各个测定管中,分别向各管加入每毫升为 25 微克 DNA 标准溶液 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 毫升,每管补加 0.1SSC 液至总体积为 4 毫升,沸水浴中加热 10 分钟(溶液变为淡红色),冷却后,加氯仿 4 毫升抽提,充分摇匀,在室温下以每分钟 1500 转的速度离心 15 分钟,使溶液分成二层,水相在上呈黄色,氯仿相在下呈淡红色,吸取水相的黄色物质,在分光光度计 OD_{490} 定量测定。以 OD_{490} 为纵坐标, DNA (微克)为横坐标,作出标准曲线。

(2) 样品中 DNA 含量测定:样品用 0.1SSC 液配成每毫升为 20 微克左右,吸取 1 毫升至测定管中,加入 0.08% 吡啶溶液 1 毫升与 12N HCl 1 毫升,加 0.1SSC 液补足到总体积为 4 毫升,以后同标准曲线制作步骤一样操作,从标准曲线求出样品中 DNA 量,再根据稀释倍数算出样品中 DNA 的含量。测定时须与制作标准曲线时用同一批试剂,同一台分光光度计。

三、紫外吸收法

核苷、核苷酸、核酸的组成成分中都含有嘌呤、嘧啶碱基。这些碱基都具有共轭双键($-C=C-C=C-$),能强烈吸收 250~290 毫微米波段的紫外光,最大吸收值在 260 毫微米左右。在定性鉴定各核苷酸类物质时,可测定它们在几个特定波长的紫外吸收值,

算出比值(250/260, 280/260, 290/260) (表 4.1)。

表 4.1 单核苷酸紫外吸收光谱的比值

核苷酸	0.0 比值		pH			
	250nm/260nm		280nm/260nm		290nm/260nm	
	2.0	7.0	2.0	7.0	2.0	7.0
5'-CMP	0.46	0.84	2.10	0.99	1.55	0.33
5'-AMP	0.85	0.80	0.22	0.15	0.038	0.009
5'-UMP	0.74	0.73	0.38	0.40	0.03	0.03
5'-GMP	1.22	1.15	0.68	0.68	0.40	0.28

与已知标准核苷酸吸收比值相比较可判断是那一种核苷酸。也可根据文献资料所载的光密度波长曲线来推断是何种物质。这一般需要有一定的工作经验。在定量测定时,可根据在特定波长(一般在 260 毫微米)的紫外吸收值计算出含量。

由于核酸中的碱基在不同 pH 下发生互变异构,而在紫外吸收光谱性质上表现出差异,碱基核苷与核苷酸的克分子消光系数在不同波长处随 pH 的不同而有变化,因此测定紫外光吸收比值与定量计算时应固定 pH,测定时一般配成 10~20 微克/毫升的浓度。

紫外吸收方法简便,快速,灵敏度高,可达 3 微克/毫升核酸的水平,但在测定粗制品时,蛋白质及色素等其他紫外吸收杂质对测定有干扰作用,大分子核酸在变性,降解后有增色现象,故对大分子核酸来说准确度较差。

目前常用的定量方法有下列几种:

(一) 标准值测定法

可用于测定碱基、核苷、核苷酸

公式:
$$\frac{\Delta x}{\Delta} \times 10 \times V_{\text{总}} \times D = (\text{微克})$$

Δ: 标准样品用 0.1N HCl 配成 10 微克/毫升浓度后在二个特定波长测得的光密度差值。

Δx: 被测样品在 0.1N HCl 溶液中在相应的二个波长测得的光密度差值。

V_总: 被测样品未稀释时的总体积(毫升)。

D: 稀释倍数。

附: 各嘌呤、嘧啶碱基的 Δ 值。

Ade. OD _{262.5} = 0.930	OD ₂₉₀ = 0.030	Δ = 0.900
Gua. OD ₂₄₉ = 0.737	OD ₂₉₀ = 0.262	Δ = 0.475
Ura. OD ₂₅₉ = 0.738	OD ₂₈₀ = 0.148	Δ = 0.590
Cyt. OD ₂₇₆ = 0.910	OD ₃₀₀ = 0.047	Δ = 0.863

计算示例: 有 5 毫升腺嘌呤洗脱液,用 0.1N HCl 稀释10倍,并以 0.1N HCl 作空白,测得:

$$OD_{262.5} = 0.311 \quad OD_{290} = 0.017 \quad \text{已知 } \Delta = 0.900$$

则洗脱液中腺嘌呤含量为

$$\frac{\Delta r}{\Delta} \times 10 \times V \times D = \frac{0.311 - 0.017}{0.900} \times 10 \times 5 \times 10 = 16.35 \text{ 微克}$$

(二) 比消光系数法

由于大分子核酸样品的分子量很难精确测定,因此,用克分子消光系数法难以测定其含量,目前常采用比消光系数法,此法也可用来测定混合核苷酸的含量。

1. 变性 DNA、RNA 的测定

公式:
$$\frac{OD_{260}(\text{甲}-\text{乙})}{0.022} \times V_{\text{总}} \times D = (\text{微克})$$

0.022: 即比消光系数,是浓度为 1 微克/毫升的变性 DNA 或 RNA 的水溶液,在 260 毫微米通过 1 厘米光径时的光密度经验值,由于变性程度不一,该值也要变化,现所采用 0.022 计算出的核酸量也为近似值。

$OD_{260}(\text{甲}-\text{乙})$: OD_{260} 甲为被测溶液在 260 毫微米的总光密度值。 OD_{260} 乙为被测溶液中加入核酸沉淀剂(见注)除去大分子核酸后在 260 毫微米处的光密度值,二者的差即为被测溶液中核酸的光密度值,测定时以水作空白对照。

$V_{\text{总}}$: 被测溶液未稀释时体积(毫升)。

D : 稀释倍数。

RNA 含量测定计算示例: 准确称取某厂生产的 RNA 样品 0.25 克,加少量蒸馏水调匀,再加水到 30 毫升。用 5% 氨水调 pH 至 6 助溶,定容至 50 毫升。助溶时氨水要慢慢逐滴加入,摇匀后再加第二滴,以防止局部过碱引起 RNA 降解。

甲: 取 2 毫升定容稀释液加 2 毫升水,再稀释 100 倍,测得 $OD_{260} = 0.440$ 。

乙: 取 2 毫升定容稀释液加 2 毫升核酸沉淀剂,待充分沉淀后,离心取上清液,稀释 100 倍,测得 $OD_{260} = 0.010$, 则 0.25 克样品中 RNA 含量 = $\frac{0.440 - 0.010}{0.022} \times 50 \times 200$
= 195,000 微克 = 0.195 克

$$\text{该样品纯度} = \frac{0.195}{0.250} \times 100\% = 78.0\%$$

注: 核酸沉淀剂

(1) 高氯酸-钼酸铵沉淀剂: 含 0.25% 钼酸铵的 2.5% 高氯酸。如配 200 毫升,即在 193 毫升蒸馏水中加入 7 毫升 70% 高氯酸和 0.5 克钼酸铵,由于钼酸铵在 260 毫微米有较大的紫外吸收值,故在上述操作步骤中加沉淀剂后稀释 100 倍再测定 OD_{260} 毫微米。

(2) 醋酸氧铀-高氯酸沉淀剂 (uPCA): 称取 0.25 克醋酸氧铀,溶于 100 毫升 2.5% 高氯酸溶液中,此试剂略有放射性,使用时用橡皮球吸,切不要用口吸。

由于测定 RNA 样品时应用的沉淀剂钼酸铵在 OD_{260} 有较大吸收,而醋酸氧铀有放射性,故有时不用沉淀剂,直接测定样品液 OD_{260} 而计算含量。

2. 天然 DNA 的测定

公式:
$$\frac{OD_{260}(\text{甲}-\text{乙})}{0.020} \times V_{\text{总}} \times D = (\text{微克})$$

0.020, 即比消光系数,是浓度为 1 微克/毫升的天然未变性 DNA 水溶液在 260 毫微

米通过 1 厘米光径时的光密度经验值。式中其他含义同 (1) 公式。

3. RNA 降解后的 3' 或 5'-混合核苷酸的测定。

公式:
$$\frac{OD_{260}}{0.032} \times V_{\text{总}} \times D = (\text{微克})$$

0.032: 浓度为 1 微克/毫升的 3' 或 5'-混合核苷酸溶液在 260 毫微米处通过 1 厘米光径时的光密度经验值。由于 RNA 降解后常含有少量核苷或其它色素, 它们也有紫外吸收, 故用此法测得的核苷酸量比定磷法高 10~15%。

$V_{\text{总}}$: 被测液未稀释时总体积(毫升)

D : 稀释倍数

(三) 克分子消光系数法

此法适用于碱基、核苷、核苷酸的定量测定, 不适用于大分子核酸, 因为它的分子量很难准确测定, 无法配制克分子浓度溶液。

公式:
$$\frac{OD_{\lambda} \times M \times D \times V_{\text{总}}}{\epsilon_{\lambda}} = (\text{毫克})$$

ϵ_{λ} : 被测碱基、核苷或核苷酸溶液在某一波长的克分子消光系数。

OD_{λ} : 被测碱基、核苷或核苷酸溶液在某一波长的光密度值。

M : 被测碱基、核苷或核苷酸的分子量。

$V_{\text{总}}$: 被测碱基、核苷或核苷酸溶液未稀释时的总体积(毫升)。

D : 稀释倍数。

计算示例: 肌苷发酵液纸上层析点样 4 微升, 紫外吸收斑点用 0.1N HCl 3 毫升洗脱, 测得 $OD_{248} = 0.400$

已知肌苷 $M = 268$, $\epsilon_{248} = 12,200$

则 4 微升中肌苷含量(也即 3 毫升洗脱液中肌苷酸含量)

$$= \frac{0.400 \times 268 \times 3}{12,200} = 0.0264 \text{ 毫克}$$

因此每毫升发酵液中肌苷含量 $= 0.0264 \times 250 = 6.6$ 毫克。

(四) 克原子磷消光系数 ($\epsilon_{(P)}$) 法^[11]

比较不同来源不同纯度的核酸样品的天然状态程度时往往采用克原子磷消光系数法, 即每升含 1 克原子磷的核酸溶液在 260 毫微米处通过 1 厘米光径时的紫外吸收值, 在 pH 7 时天然状态 DNA $\epsilon_{(P)}$ 值在 6200—6600 之间, 在变性降解时此数值大大提高, 所以可从 $\epsilon_{(P)}$ 的值初步判断核酸天然状态的程度。

公式:
$$\epsilon_{(P)} = \frac{OD_{260}}{C \times l}$$

OD_{260} : 被测核酸溶液在 260 毫微米处的光密度值。

C : 被测核酸溶液的克原子磷浓度, 用定磷法测定而得。

l : 比色杯光径。

计算示例: 用定磷法测得某 DNA 溶液含磷量为 1.5 微克/毫升, 该溶液的 OD_{260}

≈ 0.305 , 比色杯的光径为 1 厘米, 那么

$$C = \frac{1.5 \times 10^3}{31 \times 10^6} = 0.048 \times 10^{-3}$$

则
$$\epsilon_{(P)} = \frac{0.305}{0.048 \times 10^{-3} \times 1} = 6350$$

说明该 DNA 样品未变性及降解, 天然程度很高。

四、荧光法^[12]

(一) 微量测定寡核糖核苷酸 3'-末端

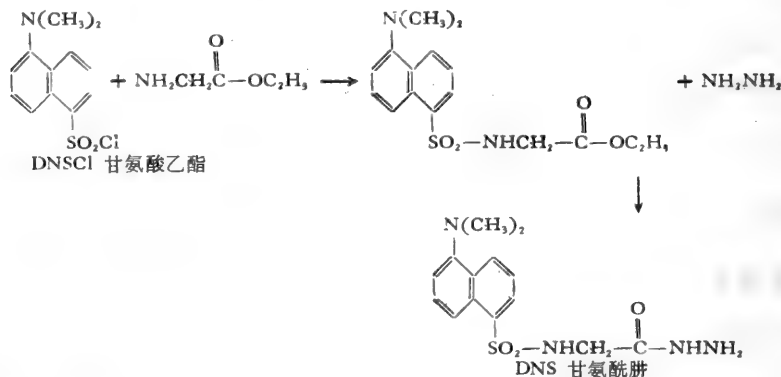
原理

寡核糖核苷酸的 3' 末端有 2', 3' 顺式羟基(若 3' 末端是磷酸, 则先用磷酸单酯酶酶解除去), 用过碘酸氧化形成双醛化合物, 与荧光试剂 1-二甲氨基萘-5-磺酰氯 (DNS-Cl) 的衍生物进行加成反应, 再用 3'-磷酸二酯酶进行水解可得到有荧光标记的 3' 末端核苷。经聚酰胺薄膜双向层析, 与标准荧光标记核苷对照, 即可确定该寡核糖核苷酸 3' 末端。

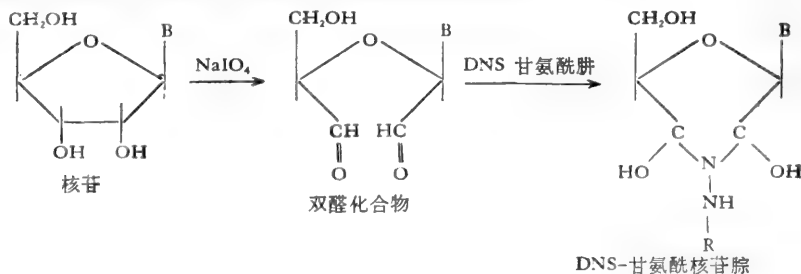
该方法比紫外吸收法灵敏约 100 倍, 检出最小量可达 $10^{-9} \sim 10^{-10} M$ 水平, 与同位素标记法比较, 仪器设备要求不高。把 β -消去反应与本方法相结合, 可测定 RNA 的小片段的顺序, 因此可用于 RNA 一级结构的分析。

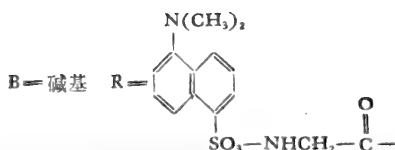
操作步骤

1. DNS-衍生物 (DNS-甘氨酸肼) 的制备



2. 标准对照样品 DNS-甘氨酸核苷腺的制备及层析





在玻管中放入待标记的 $4 \times 10^{-4}M$ 标准核苷水溶液 5 微升。加入 5 倍克分子过量的 $2 \times 10^{-3}M$ NaIO_4 水溶液 5 微升, 室温放置一小时。加入 $0.01M$ Na_2SO_3 溶液 5 微升, 室温放置半小时, 以除去过量之 NaIO_4 。加入荧光试剂 $7.5 \times 10^{-4}M$ DNS-甘氨酸肼的乙醇溶液 15 微升, 室温反应 1 小时以上。将小玻管置真空干燥器中抽数分钟至干, 再用 50% 乙醇水溶液溶解。用毛细管点样于聚酰胺薄膜 (7.5×7.5 厘米) 左下角。进行第一向层析的溶剂是甲酸: 水: 异丙醇 = 0.5: 100: 20 (V/V), 吹干后旋转 90° 进行第二向层析, 其溶剂为乙酸乙酯: 乙酸: 甲醇: 水 = 20: 2: 1: 1 (V/V) 层析图谱见图 4.1。

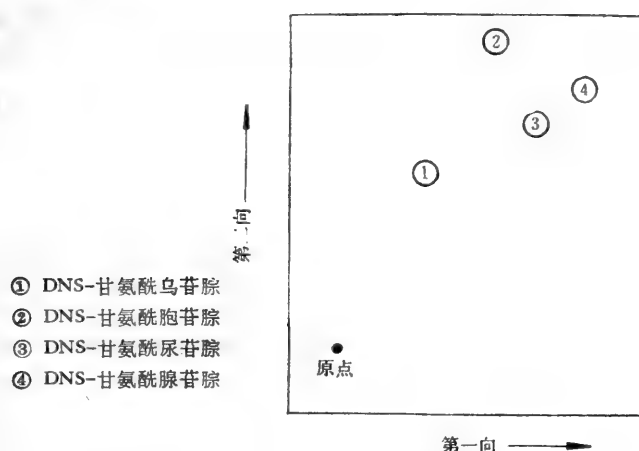


图 4.1 标准 DNS-甘氨酸核苷腺的层析图谱示意

3. 寡聚核糖核苷酸 3'-末端测定 若被测的是一个四核苷酸, 配成 16 个 OD_{260} 毫升的浓度, 取 5 微升于一小玻管中, 约 0.08 个 OD_{260} , 加入 5 倍克分子过量的 $2 \times 10^{-3}M$ NaIO_4 5 微升, 室温放置一小时, 加 $0.05M$ Na_2SO_3 溶液 5 微升, 室温放置半小时, 除去过量之 NaIO_4 。加入荧光试剂 $7.5 \times 10^{-4}M$ DNS-甘氨酸肼的乙醇水溶液 15 微升, 室温放置 1 小时以上。将小玻管置真空干燥器中抽干。加入红酵母 3'-磷酸二酯酶溶液 (每毫升含 40 毫克硫酸铵酶糊, 透析去盐后, 用 $0.1M$ NaAc 缓冲液, $\text{pH} 4.0$, 稀释 500 倍, 备用), 60°C 酶解 30 分钟, 置真空干燥器抽干, 再用 50% 乙醇水溶液溶解, 经聚酰胺薄膜双向层析 (方法同上) 后, 与标准 DNS-甘氨酸核苷腺的层析位置对照, 即可确定该寡核糖核苷酸的 3' 末端。

(二) 微量测定双链核酸

原理

荧光染料非啶溴红 (溴乙啶, 简称 EB) 与双链核酸形成络合物后在 590 毫微米有最大吸收值, 其荧光强度比原来增加 50~100 倍。在合适的条件下 (pH 、温度、离子强度等), 一定浓度的非啶溴红溶液的荧光增量与加入的核酸双链区浓度成正比, 因此可用来

测定双链核酸的浓度,灵敏度达 0.01 微克/毫升。这是七十年代发展起来的一种新方法,专一性强,灵敏度高,操作简便迅速,干扰物质很少。

由于荧光强度随温度升高而降低,测定应在恒温下进行。pH 过高或过低会破坏双链结构,降低荧光强度,一般在 pH4 ~ 10 影响不大。离子浓度对荧光强度的影响复杂,一般固定在 0.1M。

操作步骤

制作标准曲线和未知浓度样品的测定。

标准 DNA 溶液中各种物质的最终浓度为 0.1M NaCl, 0.05M Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5), 10^{-3} M EDTA (pH7.5), 2 微克/毫升 EB, 标准 DNA 的浓度为 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.14 和 0.16 微克/毫升(小牛胸腺 DNA)。并在严格一致条件下,配制各种稀释度的未知 DNA 溶液浓度。然后用荧光分光光度计测定。激发光波选择汞灯的 546 毫微米波长,发射荧光在 590 毫微米测定。发射单色光的狭缝宽度为 0.2 毫米。在仪器的最大灵敏度下测定。以纯 EB 溶液的荧光强度 (I_0) 为对照去扣除所有其它样品的荧光值 (I_1)。以 ($I_1 - I_0$) 值对 DNA 浓度作图。制得标准曲线。将未知溶液的荧光强度数值与标准曲线比较,就可测得未知溶液的浓度。

五、DNA 中 GC 克分子百分率 [(G+C)%] 的测定^[13]

DNA 分子中含有四种碱基,即腺嘌呤 (Ade), 胸腺嘧啶 (Thy), 鸟嘌呤 (Gua) 和胞嘧啶 (Cys), 它们按互补配对原则借助氢键而成对结合 (A 和 T, G 和 C)。由于鸟嘌呤与胞嘧啶间有三对氢键,腺嘌呤与胸腺嘧啶之间只有二对氢键,因此前者的结合比后者牢。含 GC 多的 DNA 热变性温度和浮力密度也高,因此测定 (G + C)% 对了解 DNA 的性质,对分离纯化 DNA 的工作等有重要意义。

测定 (G + C)% 的方法有化学方法和物理方法

(一) 化学方法

将 DNA 水解成为核苷酸或碱基,用纸层析法把他们分开。由于它们在 250—280 毫微米的紫外光区域有强烈吸收斑点,剪下吸收斑点分别洗脱后用紫外分光光度计作定量测定,由此计算出 (G + C)% ,此法费时,误差较大。

(二) 物理方法

DNA 分子的某些物理特性与不同碱基的含量成正比关系,借此可测定 (G + C)%。

1. 浮力密度梯度离心法^[14]

原理

DNA 在氯化铯 (CsCl) 溶液中的浮力决定于 GC 含量。在 7.7M CsCl 溶液中加入 DNA 样品,长时间高速离心后,由于沉降力和扩散力的综合作用,建立了 CsCl 梯度,在平衡时, DNA 分子进入和自己密度相等的区域,此处的密度称谓浮力密度。(G + C)% 越

高,密度越大,故可根据此推算出 DNA 的 $(G + C)\%$ 。

操作步骤

标准 CsCl 溶于一定的缓冲液中,加入被测的和标准的 DNA (标准 DNA 密度为 1.71 左右),以此少量溶液 (0.75 毫升左右)置于 1 毫升塑料离心管中,在超离心机中以每分钟 45,000 转的速度离心 20 小时。利用核酸对紫外光的吸收带来确定被测 DNA 和标准 DNA 的位置,测定它们与离心机转头与中心轴之间的距离 (r 和 r_0),算出被测定的 DNA 的密度 (ρ ——被测 DNA 的密度,利用公式 $\rho = \rho_0 + 0.0092(r^2 - r_0^2)$, ρ_0 为标准 DNA 溶液的密度)。根据 1962 年 Doty 所建立的公式 $\rho = 1.660 + 0.098 \times (G + C)\%$, 因此 $(G + C)\% = \rho - 1.660/0.098$ 。

根据文献资料 $(G + C)\%$ 数如下: 人(脾脏 DNA) 39 (密度 1.698); 鲑(精子 DNA) 44 (密度 1.703); 小白鼠(脾脏 DNA) 44 (密度 1.703); 鸡(肝脏 DNA) 43 (密度 1.702)。

2. 热变性温度 (T_m) 测定法^[15]

原理

当温度升高时,由于 DNA 变性引起的增色效应,使之对 260 毫微米紫外光吸收值在一个狭窄的温度范围内突然升高到最高值,这个温度范围的中点,即为该 DNA 溶液的热变性温度 T_m 。 T_m 可由 DNA 溶液的光密度的改变来测定。 T_m 与 DNA 的 GC 含量有关,GC 含量越高,热变性的温度也越高,因此测得了 DNA 的 T_m 后,就可算出 $(G + C)\%$ 。

操作步骤

把被测 DNA 溶于 0.15M NaCl (pH7.0) 中,其浓度为每毫升 20—40 微克。测定时在紫外分光光度计放比色杯部分设计一个可加温的装置,每升高 0.5°C 或每升高 1°C 读取一次 OD_{260} 值,作出 $OD_{260} \sim$ 温度曲线,从曲线中画出 OD_{260} 开始突然升高并到达最大值的一段狭窄的温度范围中点,即为热变性温度 T_m , $(G + C)\%$ 可按下面经验公式求得:

$$T_m = 69.3 + 0.41 (G + C) \quad \text{即}$$

$$(G + C)\% = T_m - 69.3/0.41$$

测定时要求被测 DNA 样品是天然未变性的,溶液中应保持 0.15M Na^+ , 无二价的金属离子存在。

根据文献资料 $(G + C)\%$ 数如下: 人(脾脏 DNA) 41 ($T_m = 86.5$); 鲑(精子 DNA) 43 ($T_m = 87.5$); 小白鼠(脾脏 DNA) 41 ($T_m = 86.5$); 鸡(肝脏 DNA) 43 ($T_m = 87.5$)。

用此法与用浮力密度梯度离心法所测得的 $(G + C)\%$ 略有不同。

从微生物和动植物中所提取的 DNA 测定结果表明, $(G + C)\%$ 的数值一般变化于 25 和 75 之间在微生物中发现同种同属的数值确是分布在一个相当狭窄的范围内,但必须了解 $(G + C)\%$ 值只代表这一生物全部染色体 DNA 的平均值,而 $(G + C)\%$ 值相等的生物不一定亲缘关系近。但是亲缘关系近的生物,其数值应相近,因而可用此法来检验人为的分类系统是否合理。

第三节 核酸的水解

核酸是由核苷酸通过磷酸二酯键相互连接而成,核苷酸又是由碱基、核糖、磷酸组成,因此,核酸在不同降解条件下可以获得碱基、核苷、核苷酸或寡核苷酸等不同产物。核酸水解大致分化学水解和酶促水解,化学水解又可分为酸水解,碱水解。

DNA 中的磷酸二酯键和糖苷键都对碱稳定,所以从 DNA 制备单脱氧核苷酸不能用碱水解法。DNA 对酸不稳定,其中糖苷键比磷酸二酯键更不稳定(特别是嘌呤糖苷键),所以用酸水解 DNA 时,只能得到无嘌呤酸(在稀酸条件下)或自由碱基(较酸条件下)。所以只能用酶法制备单脱氧核苷酸。

RNA 中由于存在着 2'-OH 基,发生邻近基团参与效应,而使磷酸二酯键对碱不稳定,所以可用碱水解法得到单核苷酸,也可用酶法制备而得。

由于 N-糖苷键对碱稳定,所以无论 DNA 或 RNA 在碱中都不能得到自由碱基, N-糖苷键对酸不稳定,一般在酸中 DNA 可以得到自由碱基, RNA 则可得到嘌呤碱基和嘧啶核苷酸。

一、化学水解法

(一) DNA 的水解

1. 过氯酸 (HClO_4) 水解 在硬质玻管中放入 DNA 5 毫克,加 100 微升 75% 过氯酸,把玻管小心地封闭,在 100℃ 水解一小时,冷却后,打开玻管用 6N KOH 中和至 pH4.0 左右(若不中和层析时会腐蚀滤纸),离心或放置片刻上清液可用于测定。

此法能将 DNA 水解成自由的嘌呤和嘧啶碱,其缺点是胸腺嘧啶有些破坏,回收量较低。

2. 甲酸水解 DNA 2.5 毫克加入 0.5 毫升 98% 的甲酸,玻管小心地封闭,在 175℃ 水解 45 分钟, DNA 能水解成自由碱基。此法也适用于 RNA,但尿嘧啶回收量低。

3. 三氟乙酸水解 DNA 1 毫克,加 40 微升无水三氟乙酸,玻管小心地封闭。在 155℃ 水解 60 分钟, DNA 能水解成自由碱基,此法的优点是加热时产生压力低,管不易破裂,回收率高达 97—100%,层析时样品无腐蚀滤纸现象。

(二) RNA 的水解

1. 盐酸水解 RNA 2 毫克,加 100 微升 1N HCl,闭管口,在 100℃ 水解 60 分钟,可得嘌呤碱基和嘧啶核苷酸,此法的缺点是在水解过程中嘧啶核苷酸可能会部分转变成核苷。

2. 碱水解 RNA 2 毫克,加 0.3N KOH 100 微升,管口封焊起来,在 37℃ 保温 18 小时,能得到 2'-和 3'-核苷酸。

DNA 一般对碱较稳定,同时嘌呤脱氧核苷酸的糖苷键又对酸很不稳定,所以尚未有较好的化学方法自 DNA 中制备单核苷酸,而须采用酶促水解法。

二、酶促水解法

原理

应用桔青霉发酵液所产生的磷酸二酯酶,从 3'-端水解 DNA 或 RNA,产生相应的 5'-脱氧核苷酸及 5'-核苷酸、该酶最适 pH 为 5.1—5.3、最适温度为 75℃,酶解时核酸的浓度为 0.5—1.0%,酶活力一般要求 100 单位/毫升(指用紫外法测得的酶活力单位)以上,酶液量 10%(V/V),酶解时间为 2 小时,酶解率可达 80% 以上。

操作步骤

1. 0.5% 核酸溶液 (pH5.2) 的配制 取核酸 0.2 克于 100 毫升三角烧瓶内,先加少量蒸馏水润湿,搅拌使溶,再加蒸馏水定容到 40 毫升,用 5% 氨水数滴调至 pH5.2。

2. 酶解 将上述溶液于 75℃ 恒温水浴中预热 5 分钟,加入活力为 100 单位/毫升以上的 5-磷酸二酯酶液 4 毫升(按 10% 体积比) 75℃ 酶解 2 小时。

3. 终止酶解 将上述反应液用氨水调 pH 到 7 放到沸水浴中,维持 15 分钟,使该酶失活,终止酶解。

4. 离心 酶解液冷至室温,转入离心管内,3000 转/分,离心 10 分钟,取上清液(含有四种 5'-核苷酸的混合物)用紫外法测定其含量,用电泳法及离子交换树脂柱层析分离鉴定四种核苷酸。

第四节 核酸水解产物的分离鉴定

核酸组成成分的分离鉴定和定量分析,是核酸工作中的一个重要的基础工作,也是核酸组成物质生产中的重要技术。核酸水解产物的分离技术,主要为纸层析(特别适宜于分离小量的嘌呤和嘧啶碱),薄层层析法(适用于小量碱基、核苷、核苷酸的快速分析),离子交换层析法(适用于分离大量的核苷酸和核酸酶解片段)。目前常用琼脂糖电泳,聚丙烯酰胺凝胶电泳分离寡聚核苷酸和不同分子量及不同形状的大分子核酸。这些方法是核酸一级结构测定的重要技术。

一、层析分离鉴定

(一) 纸层析法

原理

在核酸水解产物分离测定,特别是嘌呤和嘧啶碱的分离及其定性、定量测定中,纸层析法是较为简便有效的方法。

Chargaff 等(1947)最早把纸层析应用于核酸组成成分的分离,此后发展很快,直至今日仍广泛地应用于核酸成分的定量分析。而且,纸层析技术对于核酸中微量成分的发发现,核酸的化学结构,核酸水解酶类的专一性研究也具有重大的意义。它的特点是分析的样品量小,时间短、方法简便。以下简单介绍分离原理和溶剂系统的配制及具体操作。

纸层析的分离是根据各物质在亲水的纤维素含有水的固定相和以有机溶剂为主的移动相之间的分配系数的不同而得到分离。由于核酸的碱基具有强烈的紫外吸收特性,在紫外光下呈暗黑色吸收斑点,可在滤纸上被检出。

应用的溶剂系统是很多的,总括起来主要有:有机溶剂(多数为脂肪醇)加水;有机溶剂加水再加酸碱,或再加无机盐三类。其中,影响物质分离效果的主要是有机溶剂的水含量, pH 和离子强度等。例如变化有机溶剂—水系统的水含量,则溶质的移动会变化,一般,水含量增加,溶质的移动与其极性成比例加速。如在异丙醇—水系统中变化水含量,溶质腺嘌呤和腺苷酸的相对位置发生变换。另外,调节溶剂系统的酸碱度(pH),由于溶质的解离常数不同,它的离子化程度也就不同,从而影响了它的分配系数及其 R_f 值。如在正丁醇中性水溶液中,尿嘧啶比胞嘧啶移动得快,若在溶剂系统中加入氨,尿嘧啶的移动减速甚至比胞嘧啶还慢。这是由于在碱性条件下尿嘧啶的烯醇式羟基(pK9.5)解离,而胞嘧啶中该基团的 pK 值为 12.2,几乎不离子化的缘故。另一方面,各单核苷酸具有强极性的磷酸基,一般在非极性溶剂中不易使它们分开,若在此非极性系统中增加水和其它极性成分,或加酸减弱磷酸基的解离,核苷酸才能移动。加入无机盐,则有机溶剂和水的相互溶解度减小,溶质的分配系数变化,溶质的移动减慢。同时,溶质的溶解度减小,而滤纸的吸附增加。

将一定量的核酸水解产物点在滤纸条的一端,干后,点样端滤纸条末端浸入适合的溶剂系统的溶剂槽中,溶剂槽置于层析缸中,缸口是密闭的,缸中以溶剂蒸气饱和,溶剂从点样的一端通过毛细管效应,向另一端移动,由于溶质在水相和有机相之间不断进行着分配,沿着有机相流动的方向移动,溶质中的各种不同组分的移动速率不同时,就可以彼此分开。当溶剂的前沿走到接近滤纸的另一端时,即取出滤纸,标出溶剂的前沿位置将其干燥。然后可用适当的显色剂显色或放在紫外光下观察,由于核酸衍生物有强烈吸收紫外光的能力,而滤纸本身在紫外光下显微弱的紫外荧光,于是在有核酸衍生物的地方,显示出黑点,可用铅笔圈出。如果想长久保存,可用照相纸放在滤纸下面,用紫外光照射,显影后,有核酸衍生物的地方出现白点,而其余部分为黑色。此法除用作定性外,也可作定量测定,即把纸上各斑点剪下,在侧旁剪下相同大小的一块滤纸作对照,用 0.1N HCl 浸洗碱基或核苷酸,用分光光度计测定其紫外吸收值,从碱基的克分子消光系数,即可算出每个碱基的量。

样品经层析后往往用比移值 R_f 来表示某一化合物于纸层析谱中的位置,点子的位置定出后,即可计算出 R_f 值。

$$R_f = \frac{\text{起点至层析斑点中心距离}}{\text{起点至溶剂前沿的距离}}$$

样品中的每一种成分,在某一种溶剂系统中分别都有它们自己一定的 R_f 值。

纸层析按照溶剂的展开方向可分为上行、下行、圆形三种,采用哪种展开较适宜,可视具体情况而定。

对于各种不同的分离目的必须选择相应适合的溶剂系统,可查阅有关对此类物质分离所选用的溶剂,另外也可经过自己的实践找出满意的溶剂系统。

操作步骤(碱基的分离)

1. RNA 和 DNA 的水解 称取 RNA 和 DNA 各 5 毫克,加入 0.1 毫升 70—75% 过氯酸 (HClO_4) 在细的厚壁玻璃管中封闭,在 100°C 水浴中加热 60 分钟,水解完毕后,小心打开玻管,用 6N KOH 中和水解液,待其白色过氯酸钾 (KClO_4) 沉淀后,清液用于纸层析鉴定。

2. 标准碱基溶液的配制 称取腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶、胸腺嘧啶五种碱基各 5 毫克,其中鸟嘌呤用 1N HCl 1 毫升溶解,其余用 0.1N HCl 1 毫升溶解。

3. 层析溶剂的配制

(1) 酸性溶剂系统: 65 毫升异丙醇加 16.7 毫升 12N HCl,再加蒸馏水至 100 毫升。

(2) 碱性溶剂系统: 60 毫升正丁醇加蒸馏水 30 毫升,在分液漏斗中摇匀,然后静止,弃去水层,即成水饱和的正丁醇。

4. 点样

(1) 滤纸,裁取新华 3 号滤纸,其大小为 16×34 厘米,距离纸边 7 厘米处划一基线,从基线的中点开始,向左右二侧各间隔 2 厘米处作一记号,然后在下面标上所点样品的符号及所用溶剂系统。

(2) 点样量: 用毛细管分别将 DNA、RNA 水解液和每个标准碱基点到层析滤纸上,点的直径不要超过 4 毫米。若所用的各种碱基浓度 5 毫克/毫升(即 0.5%) 点样量 5—10 微升就够了(约相当于每个碱基量 25—50 微克),可分几次点,点一次用热风吹干再点。

5. 层析(下行) 将点样端的滤纸浸入层析船内(注意不使样品浸入),并用玻璃棒压住,让其自由端下垂,把层析缸密封,让溶剂自行下行,层析约 20 小时后取出滤纸,若要正确计算 R_f 值可在溶剂到达滤纸前沿剩下 1 厘米时取出,标出溶剂前沿的位置。

6. 测定 将取出的层析纸垂直挂于烘箱中,于 50°C 左右干燥,(也可晾干或电吹风吹干),在紫外光灯下观察碱基分离情况,用铅笔圈出各吸收斑点的位置,计算出各碱基在该溶剂系统中的 R_f 值,与标准的碱基对照,确定 RNA 水解液中腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶四种碱基或 DNA 水解液中腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶四种碱基在层析谱上的位置。若需定量测定,将碱基斑点用 0.1N HCl 洗脱下来,测定特定波长的紫外吸收值,从它们的各自克分子消光系数,计算其含量。

例: 腺嘌呤发酵液,点样量 20 微升,进行层析,层析后的紫外斑点用 0.1N HCl 3 毫升进行洗脱,测得 $\text{OD}_{260} = 2.0$, 根据腺嘌呤在 0.1N HCl 中的克分子消光系数,从下式算出每毫升发酵液中腺嘌呤的含量

$$\frac{\text{OD}_{260} \times M \times \text{稀释倍数}}{\text{克分子消光系数} \times 10^{-3}} = \text{微克}$$

$$\text{因此 20 微升中腺嘌呤含量为 } \frac{2.0 \times 135 \times 3}{13150 \times 10^{-3}} = 62.3 \text{ 微克}$$

$$\text{每毫升发酵液中腺嘌呤含量为 } 62.3 \times 50 = 3115 \text{ 微克} = 3.115 \text{ 毫克。}$$

操作步骤

(RNA 水解产物核苷酸的分离,附标准核苷及核苷酸的层析)

1. RNA 的水解 称取 RNA 2 毫克,加 0.3N KOH 100 微升,管口封焊,在 37℃ 保温 18 小时,得到 2'-和 3'-单核苷酸,加少量水稀释,水解液用氢型阳离子交换树脂除去 K⁺,或用 HClO₄ 便呈 KClO₄ 沉淀,把 K⁺ 除去,并调节 pH 至 7.0 左右。

2. 标准核苷及核苷酸溶液的配制 称取脱氧腺嘌呤核苷 (dA), 脱氧尿嘧啶核苷 (dU), 脱氧胞嘧啶核苷 (dC), 脱氧胸腺嘧啶核苷 (dT), 脱氧鸟嘌呤核苷 (dG), 3'-AMP, 3'-CMP, 3'-UMP 各 10 毫克,其中 dA、dG、AMP、GMP 和混合样品(含上述样品各 10 毫克)用 0.1N HCl 1 毫升溶解,其它用 0.01N HCl 1 毫升溶解。

3. 层析的溶剂系统

(1) 硫酸铵饱和液:柠檬酸—柠檬酸钾缓冲液 (0.05M pH2.5):异戊醇 = 70.5:15:4.5(V/V) pH3.7—4.0。硫酸铵饱和液配制后过滤,柠檬酸—柠檬酸钾缓冲液先配成 0.1M 柠檬酸,在 pH 计指示下加入 0.1M 柠檬酸钾至 pH2.5,有混浊过滤之,再稀释至 0.05M,加入异戊醇后混匀放置,取下层,测 pH2.6 左右,加浓氨水,调 pH3.8—3.9。

(2) 硫酸铵饱和液:氨水 (0.2M):异戊醇 = 25:4:1(V/V) pH6.8—7.0, 取下层其 pH 为 7.6 左右,加硫酸调至 pH6.8—6.9。

点样、层析、测定见单向纸层析法分离核酸水解液碱基成分的操作步骤。 计算各核苷和核苷酸在上述二种溶剂系统中的 R_f 值,与标准的核苷、核苷酸对照,确定核苷和四种核苷酸在层析谱上的位置。 各核苷酸还可利用紫外吸收光谱的比值来鉴定,即剪下含有各核苷酸及相应空白对照的滤纸后,用 0.015N HCl 3 毫升浸泡 6—8 小时,常加摇动(洗脱下来的溶液 pH 为 2.0 左右),离心后上清液用紫外分光光度计测定 OD₂₆₀ 及 OD₂₅₀/OD₂₆₀, OD₂₈₀/OD₂₆₀, OD₂₉₀/OD₂₆₀ 的值,以鉴定各点。若需定量测定可根据 OD₂₆₀ 的吸收值,计算出含量(以微克/毫升的单核苷酸溶液在 260 毫微米通过一厘米光径时的光密度为 0.032 计算)。

在 pH3.8 硫酸铵饱和系统中 dA, dG 不易分开,而 dA 或 dG 与 dU, dT 能分开。各核苷酸基本上能分开。

在 pH6.9 硫酸铵饱和系统中 dA, dG, dT 与 dU 基本上能分开, 而 CMP, UMP 不易分开而它们与 AMP, GMP 能分开(见表 4.2)。

表 4.2 核苷和核苷酸在上述二种溶剂系统中 R_f 值
(新华 3 号滤纸 20℃ 左右下行)

化合物	R _f pH3.8 硫酸铵饱和系统	R _f pH6.8 硫酸铵饱和系统
dA	0.22	0.05
dG	0.18	0.11
dT	0.39	0.33
dU	0.50	0.45
3'-AMP	0.29	0.13
3'-CMP	0.83	0.59
3'-GMP	0.33	0.31
3'-UMP	0.64	0.60

文献资料中分离 RNA 水解液的单核苷酸及核苷酸的异构体 (2' 和 3') 层析溶剂系统有如下几种^[16]:

1. 硫酸铵饱和溶液:柠檬酸—柠檬酸钾缓冲液 (0.05M, pH2.5):异戊醇 = 70.5:15:

4.5 pH3.7—4.0

2. 硫酸铵饱和溶液:氨水 (0.2M):异戊醇=25:4:1, pH6.8—7.0。

3. 硫酸铵饱和溶液:氨水 (0.2M):异戊醇=15:4:1 pH6.6—6.8。

4. 硫酸铵饱和溶液:水:氨水 (0.01M):异戊醇=24:3:2:1, pH5.7—5.9。

5. 硫酸铵饱和液:异戊醇=19:1 pH5.6—5.8。

6. 硫酸铵饱和液:硼酸钠—氢氧化钠缓冲液 (0.1MpH10):异戊醇=20:9:1, pH6.8—7.0。

硫酸铵饱和溶液是在 25℃ 左右配制的(饱和溶液配制的温度须与层析的温度一样),使用前 25℃ 左右过滤、各成分按比例混和后振摇一定时间,放置后分成水相(下相)及有机相(上相)层析溶剂是使用下相。

RNA 碱水解液中的单核苷酸在各溶剂系统中的 R_f 值如下表所示。

表 4.3 RNA 碱水解液中的单核苷酸在溶剂系统中的 R_f 值
(新华 3 号滤纸, 25℃ 左右, 下行)

溶剂系统	R_f 值							层析 时间(小时)
	3'-AMP	2'-AMP	3'-GMP	2'-GMP	3'-CMP	2'-CMP	3'UMP 2'UMP	
1	0.50	0.60	0.45	0.55	0.85		0.71 0.76	21—22
2	0.12	0.20	0.31	0.42	0.58	0.71	0.65	29—30
3	0.15	0.24	0.37	0.49	0.67	0.73	0.67	29—30
4	0.20	0.31	0.44	0.53	0.71	0.77	0.71	20—21
5	0.11	0.19	0.31	0.52	0.67		0.62	28—30
6	0.21	0.33	0.47	0.57	0.72	0.78	0.72	25—26

附: 嘌呤,嘧啶等在九个层析溶剂系统中的 R_f 值^[27] 如表 4.4 所示。

溶剂系统:

(1) 叔丁醇:丁酮:甲酸:水 = 40:30:15:15(V/V)

(2) 叔丁醇:丁酮:水:氨水 = 40:30:20:10(V/V)

(3) 正丁醇:冰醋酸:水 = 50:25:26(V/V)

(4) 水:仲丁醇:叔丁醇=48.4:43:8.6 (取上层) (V/V)

(5) 异丙醇:水:浓盐酸 = 65:18.4:16.6(V/V)

(6) 仲丁醇和水混合取上层

(7) 乙酸乙酯:甲酸:水 = 70:20:10(V/V)

(8) 乙酸乙酯:水:甲酸 = 60:35:5(V/V)

(9) 叔丁醇:丁酮:水:甲酸 = 44:44:11:0.26(V/V)

(二) 薄层层析法

薄层层析法是近十几年来新发展起来的重要分析技术方法之一,它的主要优点是比纸层析展层迅速,一般只需几分钟到几十分钟,灵敏度比纸层析大 10—100 倍,1—2 微克核苷酸就能很好检出,操作简便,也可使用腐蚀性的显色剂。

薄层层析除了与纸层析一样分配原理外,还由于层析材料的不同而异,如用无机硅胶或离子交换纤维素,则主要是吸附原理或离子交换原理。

表 4.4 碱基等物质在不同溶剂系统中的 R_f 值

化合物名称 <div><div><div>R_f 值</div><div>溶剂系统</div></div></div>	R _f								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
腺嘌呤	0.48	0.40	0.65	0.71	0.33	0.63	0.37	0.6	0.33
胞嘧啶	0.45	0.49	0.53	0.48	0.45	0.37	0.32	0	0.15
鸟嘌呤	0.23	0.19	0.45	0.42	0.22	0.36	0.13	0	0.11
次黄嘌呤	0.38	0.35	0.53	0.57	0.28	0.49	0.25	0.6	0.26
乳酸	0.38	0.23	0.39	0.31	0.57	0.15	0.34	0.9	0.6
胸腺嘧啶	0.62	0.56	0.68	0.77	0.80	0.70	0.61	0.34	0.61
尿嘧啶	0.50	0.41	0.56	0.65	0.69	0.55	0.46	0.21	0.47
黄嘌呤	0.24	0.27	0.45	0.46	0.25	0.41	0.21	0	0.22

常用来分离核酸类物质的支持物有 DEAE-纤维素粉、纤维素粉、硅胶粉、聚酰胺薄膜等。

下面分别介绍 DEAE-纤维素粉及硅胶粉应用示例。

DEAE-纤维素薄层层析

原理

应用纤维素粉或其他吸附剂进行分配薄层层析或吸附层析来分离核苷与核苷酸的混合物,各种核苷酸混合物和 AMP、ADP、ATP 等所得结果往往不够理想,而应用 DEAE 纤维素进行离子交换薄层层析其分离效果较好,这是由于它对分子量大小相同而在一定的 pH 值时,带电荷略有差异的各种核苷酸有较大的分离能力。例如在 pH2.0 或 pH2.3 下各核苷酸的第一磷酸基全部解离,而各核苷酸的氨基 (NH_3^+) 由于 pK 值的不同,解离情况有差异,因此各核苷酸带负电荷的数量是 $\text{UMP} > \text{GMP} > \text{AMP} > \text{CMP}$,而上行距离是 $\text{CMP} > \text{AMP} > \text{GMP} > \text{UMP}$,核苷没有磷酸基,与 DEAE-纤维素不发生交换,因此上行到接近溶剂前沿。

由于 AMP、ADP、ATP 带有磷酸基团的数量不同,因此在 pH3.5 溶剂系统中三者带有负电荷数量 $\text{ATP} > \text{ADP} > \text{AMP}$,因此它们迁移距离不同从而达到分离的目的。

一般定性鉴定时最小检出量为 1—2 微克核苷酸,可应用此法与紫外分光光度法配合进行定量测定。

各核苷与对应核苷酸的分离

试剂

- (1) 各种核苷及脱氧核苷 10 毫克,除 G、dG 用 1N HCl 1 毫升溶解,其余分别用 0.1N HCl 1 毫升溶解。
- (2) 各种核苷酸及脱氧核苷酸10毫克分别溶于 1 毫升 0.1 NHCl 中。
- (3) 混合样品: 核苷与核苷酸各 10 毫克溶于 1 毫升 0.1N HCl 中。
- (4) 溶剂系统:

- (a) 0.01N HCl (pH2.0)。
(b) 0.005N HCl (pH2.3)。

操作步骤

1. DEAE-纤维素处理成 Cl^- -型 国产的 DEAE-纤维素或“Serva”DEAE-纤维素用 1N NaOH 浸泡一小时,蒸馏水洗至中性。1N HCl 浸泡一小时,蒸馏水洗至中性,离心,即得糊状 DEAE-纤维素 (Cl^- -型),冰箱保存备用。

2. 铺层 把处理过的 Cl^- -型 DEAE-纤维素加水充分调匀(干粉:水 = 1:12W/W),铺于洁净玻板上,室温下放在水平处,待层面固定后,于 60℃ 烘箱中烘干(烘箱垫板应用水平仪校正)、加水调匀后的纤维素浆 100 克约可铺 10 × 20 厘米板 3 块,放置干燥器中备用。

3. 点样与鉴定 点样前将 7 × 10 厘米板在 60℃ 烘箱中烘 15—30 分钟,在离玻璃板边缘 1—1.5 厘米处用毛细管点样,点样量 1—2 微升(含样品 10—20 微克)待点上样品干后放入溶剂系统 (a) 或 (b),在室温下展层 3—5 分钟,溶剂前沿从点样线起上行 7—7.5 厘米,取出后吹干或在 60—80℃ 烘箱中烘干,于紫外光灯下观察,用铅笔画出斑点位置。

4. 结果 用这二种溶剂系统已分离了各对核苷—核苷酸及各对脱氧核苷—脱氧核苷酸。各核苷皆上行到溶剂前沿,而核苷酸则上行较少,因而相互分开。各核苷酸的上行距离略有差异 $\text{CMP} > \text{AMP} > \text{GMP} > \text{UMP}$, 脱氧核苷酸上行距离 $\text{dCMP} > \text{dAMP} > \text{dGMP} > \text{dTMP}$ 。

若用 0.02N HCl (pH1.7) 展层, dCMP 和 dAMP 上行太快,不易与其对应的核苷分开;用 0.0003N HCl (pH3.5) 展层,则 UMP 和 dTMP 基本停留原点,故这二种溶剂不宜采用。

AMP—ADP—ATP 的分离

试剂

1. AMP, ADP, ATP 各 10 毫克用 1 毫升 0.1N HCl 溶解。

2. 溶剂系统

(1) 0.1M 柠檬酸钠缓冲液 (pH3.5)

(2) 0.02M HCl (pH1.7)

3. 结果 由于 AMP 分子上只有一个磷酸基团, ADP 有二个, ATP 有三个, 因此,在同一 pH 条件 (pH1.7 或 pH3.5) 下,由于磷酸基的解离而使三者带负电荷的数量 $\text{ATP} > \text{ADP} > \text{AMP}$, 从而在阴离子交换纤维素上被分开, 上行距离 $\text{AMP} > \text{ADP} > \text{ATP}$ 。

在 0.01N HCl (pH2) 展层时,核苷酸带负电较 pH1.7 时为多,展层后 ATP 基本停留原点,故不宜采用。但在 pH3.5 HCl 展层时,三者带负电荷更多,上行距离比 pH2 时更少,亦不宜采用。但在 pH3.5 柠檬酸—柠檬酸钠缓冲液中三者上行距离却要比 pH2 的 HCl 中增大,这说明用 DEAE-纤维素薄板层析时,样品上行距离不仅与 pH 有关,也与溶剂系统性质有关。

滤纸延展单向双级展层分离混合核苷酸

试剂

- (1) 混合核苷酸的配制见前。
- (2) 溶剂系统: 第一级 0.005N HCl (pH2.3)
第二级 0.05N HCl (pH1.3)

操作步骤

1. 点样 取20厘米长的 DEAE 纤维素板, 在薄板上端接一张宽度与板相同, 长为8—10 厘米的新华层析滤纸, 设法使滤纸紧贴薄层, 点样量 1—2 微升(含 10—20 微克), 其余操作同前。
2. 展层 于密闭层析缸中室温下用 0.005N HCl (pH2.3) 展层 30—40 分钟, 溶剂前沿从点样线起上行 17 厘米时, 取出薄板, 直接置于另一密闭层析缸中, 用 0.05N HCl (pH1.3) 室温继续展层 60—70 分钟, 溶剂上行 8—9 厘米, 80℃ 烘干。为缩短层析时间, 展层应在密闭层析缸中进行。用滤纸延展法可节约板长, 若不用滤纸延展, 用 30 厘米长的薄板亦有同样效果。
3. 结果 用上述方法已使四种 3'-核苷酸混合物得到分离。上行距离 $CMP > AMP > GMP > UMP$ 。

定量测定

操作同定性分离测定。点样量约在 10—20 微克之间, 点样时在薄层上应留出一条适当的位置以作定量时的空白对照用。展层后用刀片把各斑点部位的 DEAE-纤维素作适当扩大后整片刮下, 并在空白对照的相应 R_f 部位刮下等面积的薄层, 用洗净的剪刀剪碎, 分别放入离心管中, 每管加入 0.1N HCl 4 毫升, 在室温下放置 4 小时, 并间歇地加以振荡, 然后离心 10 分钟 (3500 转/分钟), 小心倒出上清液(防止纤维素屑进入测定杯中)。在紫外分光光度计下测定光密度 (OD_{260}) 值, 计算含量。

硅胶薄层层析

试剂

1. 样品的配制

- (1) 碱基 Ade、Cyt、Gua、Thy、Ura 10 毫克/毫升, 其中 Gua 和混合样品用 1N HCl 溶解, 其他用 0.1N HCl 溶解。
- (2) 核苷 dA dG dT dU 10 毫克/毫升, 其中 dG 和混合样品用 0.1N HCl 溶解, 其他用 0.01N HCl 溶解。
- (3) 核苷酸 3'-AMP, 3'-CMP, 3'-GMP, 3'-UMP 10 毫克/毫升, 其中 AMP、GMP 和混合样品用 0.1N HCl 溶解, 其他用 0.01N HCl 溶解。

2. 溶剂系统

- (1) 正丁醇水饱和液: 分析纯正丁醇于分液漏斗中加水剧摇后, 放置过夜分层, 取上层。

- (2) 异丙醇 (C. P.): 浓氨水 (A. R.): 水 = 6:3:1(v/v) 互溶。
- (3) 正丁醇 (A. R.): 醋酸 (A. R.): 水 = 5:2:3(v/v) 互溶。
- (4) 硫酸铵饱和液: 氨水 (0.2M): 异戊醇 = 25:4:1(v/v) 取下层。

操作步骤

1. 铺层 通常用作薄层层析的硅胶 G, 是一种已添加了粘合剂的硅胶粉, 它含有 12—13% 的石膏 (CaSO_4), 如果是自制的 200—300 目硅胶粉, 铺板时加入 13% 的无水 CaSO_4 。称取硅胶 G 9 克加 14 毫升左右蒸馏水, 立即调匀成浆状后(此步操作时间不宜过长, 否则其中石膏要凝固而铺层不好)倒入 10×20 厘米洁净干燥玻板中, 慢慢抖动铺平, 水平放置凝固后, 在 100°C 烘干, 放于干燥器中保存, 使用前于 120°C 烘箱中活化 3 小时。

2. 点样 在离玻板边缘 1—1.5 厘米处用毛细管点样, 点样 1—2 微升(含样品 10—20 微克), 点的直径约 2 毫米左右。待样品吸收后展层, 展层分离后 $50—60^\circ\text{C}$ 烘 2—3 小时, 紫外光灯下观察, 画出斑点位置, 标算 R_f 值, 所得结果如下表所示:

表 4.5 碱基、核苷和核苷酸在各种溶剂系统中 R_f 值

化合物	R_f 正丁醇水饱和液	R_f 异丙醇:浓氨水:水	R_f 正丁醇:醋酸:水	R_f 硫酸铵饱和液:氨水:异戊醇
腺嘌呤	0.50	0.88	0.74	0.34
胞嘧啶	0.32	0.77	0.62	0.60
鸟嘌呤	0.09	0.80	0.71	0.23
胸腺嘧啶	0.76	0.90	0.80	0.46
尿嘧啶	0.68	0.88	0.79	0.74
脱氧腺苷	0.44	0.82	0.79	0.26
脱氧鸟苷	0.08	0.69	0.71	0.17
脱氧胸苷	0.56	0.78	0.72	0.40
脱氧尿苷	0.50	0.76	0.71	0.62
3'-腺苷酸	0.10	0.33	0.34	0.32
3'-胞苷酸	0	0.09	0.27	0.47
3'-鸟苷酸	0	0.09	0.12	0.57
3'-尿苷酸	0	0.07	0.36	0.56

(三) 离子交换树脂柱层析法

Cohn 等人 (1949) 最初发展了用离子交换层析分离核酸组成成分的方法^[18], 至今广泛地应用于这些成分的定性、定量分析和生产制备方面。纸上层析和纸电泳适用于小量核酸水解物的分离, 柱层析适于分离比较大量的核酸水解产物。离子交换树脂柱层析已普遍地应用于核酸类物质的分析和生产。

离子交换树脂种类很多, 根据其活性基团(亦称为离子交换基团)的不同, 有强酸性阳离子交换树脂, 常用的为聚苯乙烯-二乙烯苯为母体的强酸性阳离子树脂, 它具有活性磺酸基- SO_3H (国产树脂 732 以及 Dowex-50 等); 有强碱性阴离子交换树脂, 它具有活性的季胺基- $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{OH}^-$ (国产 717、711, 上海化工学院粉末阴树脂 201 \times 8, Dowex-1, Dowex-2 等); 有弱酸性阴离子树脂, 具有一 COOH 基 (Zerolite 226, Amberlite IRC-50);

有弱碱性阳离子交换树脂,具有一 $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 基。

为了用离子交换法来分离核苷酸,必须使各核苷酸显示对交换树脂有不同的亲和性,这个亲和性是由若干因素所决定的,例如:待分离物质的离子化状态,非极性吸附等,而最重要的是被交换物质的净电荷数。每个物质的净电荷数是由解离度来决定的,而解离度又由溶液的 pH 值决定。因此,要了解核苷酸的离子交换分离,必须弄清楚核苷酸各解离基团的解离度和 pH 的关系,也就是各核苷酸分子的净电荷数和 pH 的关系(见图 4.2)。

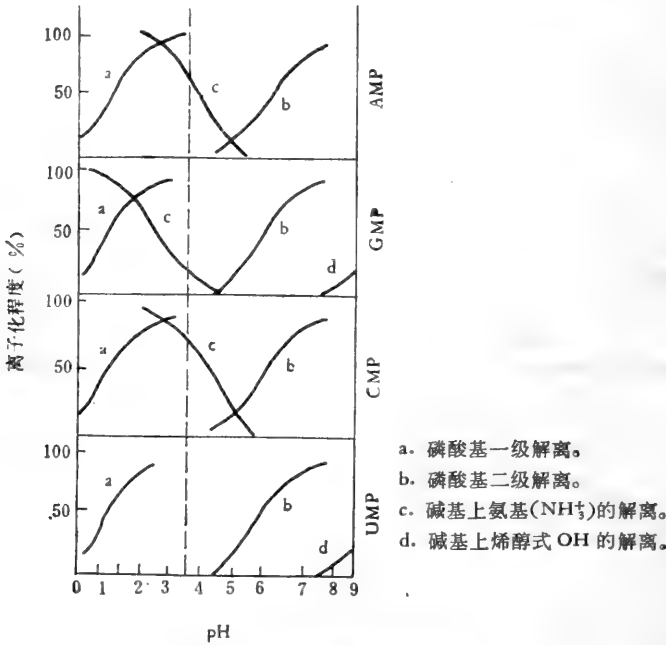


图 4.2 单核苷酸的解离曲线

表 4.6 为核酸各成分解离基团的 pK 值。

从表 4.6 可以看出,核苷酸可解离的基团是氨基、烯醇基和磷酸基,它们的解离常数是进行离子交换层析分离的基础。烯醇基的 pK 值常在 9.5 以上,此 pK 值一般不适用于核苷酸的分离,氨基和磷酸基都很重要,磷酸基一级解离的 pK 值为 0.7—1.0,相互的数值比较接近,因此不宜用作分离的依据,各种核苷酸的氨基 (UMP 除外) 的 pK 值却不同,它们的 pK 值在 2—5 之间,相差较大,在离子交换层析分离中起着决定性的作用。

离子交换分离过程可以分为二步: 第一步为交换吸附,即在物质分配系数差异大的条件下,使分离物质吸附于树脂顶部。第二步为洗脱过程,即在树脂柱中流过适当的溶剂,减弱物质对树脂的亲和力,并在各物质的分配系数有差异的条件下,先后分离洗脱下各物质。所以离子交换树脂分离的主要问题,在于调节树脂和物质之间的亲和力,以造成各物质的分配系数的差异而得到分离。

对于核苷酸的离子交换层析,其吸附条件是: 使用阳离子交换树脂时应使各核苷酸尽可能多带正电荷,使用阴离子交换树脂时应使各核苷酸尽可能多带负电荷。

要使各核苷酸尽可能多带负电荷,就要使核苷酸上的磷酸基一级解离 (pK1 左右), $-\text{NH}_3^+$ (pK4.4—2.3), 磷酸基二级解离 (pK6 左右) 都完全。 所以用阴离子交换树脂吸

表 4.6 核酸各成分解离基团的 pK 值

成 分	磷酸基一级解离	氨 基 ($-\text{NH}_3^+$)	磷酸基二级解离	$\begin{array}{c} \text{—N—C—} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{O} \end{array}$	咪唑基 $\begin{array}{c} \text{—N—} \\ \\ \text{H} \end{array}$	糖基
腺嘌呤		4.1—4.2			9.8	
鸟嘌呤		3.2—3.3		9.3—9.6	12.3	
尿嘧啶				9.5		
胸腺嘧啶				9.9		
胞嘧啶		4.6		12.2		
5-甲基胞嘧啶		4.8—4.6		12.4		
腺核苷		3.4—3.6				12.5
鸟核苷		1.6		9.2		12.3
尿核苷				9.2—9.3		12.3
胞核苷		4.1—4.2				12.3
胸腺核苷				9.8		12.3
2'-腺苷酸	0.89	3.79	6.12			
3'-腺苷酸		3.56	6.06			
5'-腺苷酸		3.89	6.48			
鸟苷酸	0.7	2.3	5.92	9.35		
尿苷酸	1.02		5.88	9.43		
胸腺核苷酸	1.6		6.5	10.0		
2'-胞苷酸		4.36	6.2			
3'-胞苷酸	0.8	4.28	6.0			
5'-胞苷酸		4.44	6.07			

附核苷酸的 pH 应为 6—8。

要使各核苷酸尽可能多带正电荷,则相反,尽量使这些基团都不解离,同时也应考虑嘌呤核苷酸对酸的稳定性,所以用阳离子交换树脂吸附核苷酸的 pH 应在 1.5 左右。

对于洗脱过程,就要降低亲和力,又要造成分配系数的差异。主要靠调节洗脱液的 pH,控制各核苷酸的不同离子化程度。同时,可增加洗脱液中竞争性离子的浓度,以增加洗脱速度。

使用阴柱时,可用稀酸做洗脱液,逐步降低 pH,减少各核苷酸的负电荷,致使它们先后被洗脱下来。由于各核苷酸的 $-\text{NH}_3^+$ 的 pK 值分别为: CMP 4.28, AMP 3.56, GMP 2.3, UMP 没有 $-\text{NH}_3^+$ 。根据 $-\text{NH}_3^+$ 的解离式: $-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons -\text{NH}_2 + \text{H}^+$, pK 愈大, $-\text{NH}_3^+$ 的解离能力愈小,即 $-\text{NH}_2$ 结合 H^+ 能力愈强。所以用酸洗脱过程中,随 pH 下降,四种核苷酸的相对分配系数都逐渐降低(图 4.3 和 4.4),首先是 CMP 结合 H^+ 成为正离子而被洗脱下来。阴柱洗脱的顺序似乎应为 CMP、AMP、GMP、UMP,但是实际洗脱过程,还需要考虑非极性吸附。据实验测定,嘌呤对聚苯乙烯树脂母体的非极性吸附比嘧啶大三倍。实际洗脱顺序就为 CMP、AMP、UMP、GMP。

使用阳柱分离时,可用水洗脱,逐步提高 pH,减少各核苷酸的正电荷,而使它们先后被洗脱下来。根据同样的原理,由 $-\text{NH}_3^+$ 的解离能力来分析,阳柱的洗脱顺序似乎应为 UMP、GMP、AMP、CMP。由于非极性吸附,实际洗脱顺序应为 UMP、GMP、CMP、AMP。

阳 柱 分 离

操作步骤

1. 阳离子交换树脂的预处理及转型 聚苯乙烯—二乙烯苯的强酸性阳离子交换树脂交换基团 ($-\text{SO}_3\text{H}$), 交换量 4 毫克当量/克干树脂。

市售的商品聚苯乙烯型的强酸性离子交换树脂多以钠型供应。由于新的交换树脂中常含一些水溶性杂质, 所以要先用酸碱处理除去。

(1) 新树脂先用水浸泡, 以浮选法去除漂浮物及杂质;

(2) 用相当于树脂体积四倍的 1—2N NaOH 缓慢流洗, 再用蒸馏水洗涤到近中性;

(3) 用相当于树脂体积四倍的 1—2N HCl 缓慢流洗, 再用蒸馏水洗涤到近中性;

(4) 重复 (2)—(3) 步骤一次;

(5) 用适当试剂处理, 使成为所要的型式(如 H^+ 型用 1—2N HCl 处理, Na^+ 型用 1—2N NaOH 或 NaCl 处理, 本实验中为 H^+ 型, 故最后用 HCl 处理);

(6) 最后用水洗至中性, 待用。

2. 装柱 对于分析实验, 如要分析分离 10—20 毫克的 RNA 水解液, 样品溶液的浓度以每毫升 1.5—3 毫克为宜(总的上柱量为 10—20 毫克左右), 选用柱长约 20—30 厘米, 柱径为 0.8—1.0 厘米左右。

柱先用铁架、铁夹垂直固定, 在经过预处理的离子交换树脂中加入少量蒸馏水, 搅匀, 缓慢倒入柱内, 然后打开下端活塞, 边排水边继续加树脂(注意勿使水面低于树脂表面), 直至树脂高度达 15 厘米左右。要求树脂内无气泡, 更不能有树脂层断裂现象, 树脂沉降要均匀, 无明暗界面产生, 树脂表面应水平, 装完后, 为使柱稳定, 可用蒸馏水流过, 平衡过夜, 待用。

3. 加样 加样前, 阳离子交换层析柱先用相当于树脂体积二倍的 pH1.5 的 0.03N HCl 平衡, 待流出液 pH 值为 1.5 时, 即可上柱。

把树脂表面多余之液体用滴管轻轻地吸去后, 用移液管沿柱壁缓缓加入样品, 即核酸水解液或四种单核苷酸的混合液(此混合液事先用 6N HCl 调至 pH 1.5) 含核苷酸共 20 毫克。注意不使树脂表面扰动, 打开下端活塞, 样品被吸收后, 立即用少量 pH 1.5 水将玻璃柱内表面吸附着的样品洗下, 再在柱表面上加蒸馏水并加塞, 然后和柱上端蒸馏水洗脱液接通, 用蒸馏水进行洗脱。

4. 流出液的收集 在 pH1.5 时, AMP、CMP、GMP 上的氨基带正电荷, 可被阳离子交换树脂所吸附, UMP 没有氨基, 不带正电荷, 直接流出, 不被树脂吸附, 当用蒸馏水洗脱时, 随着 pH 的升高, GMP、CMP、AMP 上的氨基解离度增大的程度不同, 而先后失去在阳离子交换树脂上的吸着能力, 按 GMP、CMP、AMP 顺序流出。

应用自动部分收集器收集洗脱液, 流速控制在 3 毫升/5 分钟(流速可通过洗脱瓶的高度来调节), 如果树脂的吸附作用较强, 为了缩短洗脱的全过程, 用蒸馏水将 UMP、GMP、CMP 洗下后, 可换用 3% NaCl 洗脱, 以增加竞争性离子的强度, 减弱树脂的吸附作用, 使 AMP 提早洗出。用紫外分光光度计测定各管流出液的 OD_{260} 值。

柱层析分离完毕后, 把同一峰的收集液合并, 在 OD_{260} 测其吸收值, 根据总体积, 可计

算出每种核苷酸的量,计算回收率,若要定性鉴定各峰成分,则可根据峰形选择适当的管号用纸电泳法鉴定(见电泳分离鉴定部分)。

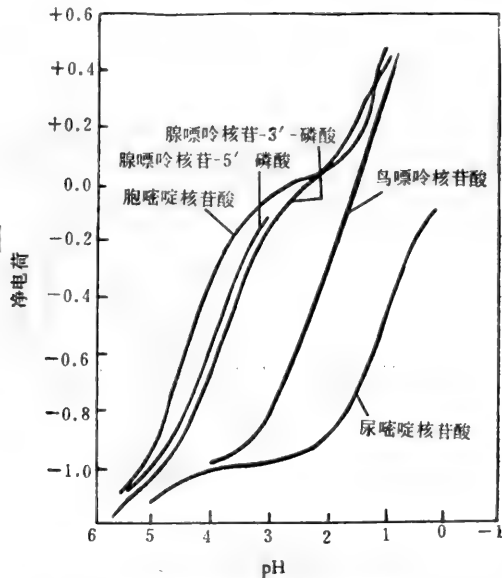


图 4.3 各个核苷酸分子上的净电荷与 pH 的关系。

阴 柱 分 离

操作步骤

1. 阴离子交换树脂的预处理及转型 国产 201×8 强碱性阴离子交换树脂苯乙烯一二乙烯苯[CH₂N⁺(CH₃)₃Cl⁻]交换量 3 毫克当量/1 克干树脂,用 3—4 倍体积 1N NaOH 浸洗 1—2 小时,用蒸馏水洗至中性,再用 3—4 倍体积 1N HCl 浸洗 1—2 小时,用蒸馏水洗至中性备用,此时树脂处理成 Cl⁻型

2. 装柱 同阳离子交换树脂装柱方法。

3. 加样 加样前,阴离子交换层析柱,先用相当于树脂体积二倍的 pH7.2 的水(以稀 NaOH 溶液调 pH)平衡,待流出液 pH 值为 7.2 时,即可上柱。

把树脂表面多余之液体用滴管轻轻地吸去后,用移液管沿柱壁缓缓加入样品,即四种单核苷酸的混合液(此混合液事先用 6N NaOH 调至 pH7.2),含核苷酸量共 20 毫克。注意不使树脂床表面扰动,打开下端活塞,样品被吸收后,用少量的 pH 7.2 水将附着在玻璃柱内表面的样品洗下。

4. 洗脱与收集 上述四种核苷酸的混合液用 6N NaOH 调至 pH7.2 后,各单核苷酸的磷酸基解离而带上负电荷,可被阴离子交换树脂吸着。当用 0.0025N (pH2.6 左右) HCl, 0.0035N (pH2.46 左右), 0.005—0.0075N (pH2.3—2.1) HCl, 0.010N (pH2 左右) HCl 分段洗脱时,随着 pH 的降低,磷酸基解离度也逐渐降低,这时四个单核苷酸的相对分配系数都逐渐降低(见图 4.4),当 pH 2 以上时, CMP 的相对分配系数的数值降低减少得最快。因此阴柱的洗脱顺序为 CMP、AMP、GMP、UMP。但是由于嘌呤对苯

乙烯型交换树脂的非极性吸附比嘧啶大三倍，因此实际洗脱顺序为 CMP、AMP、UMP、GMP。流出液的测定和鉴别见阳离子交换树脂部分。

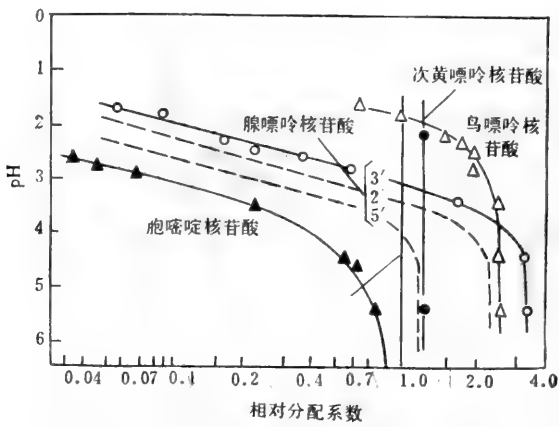


图 4.4 核苷酸的相对分配系数与 pH 的关系

二、电泳分离鉴定

(一) 纸电泳分离核苷酸

原理

核酸组成成分具有各种各样的解离基团，因此可以在它们解离状态差异较大的 pH 条件下进行电泳分离。Gordon, Reichard, Davidson 等 (1951) 最初做了核酸组成成分的电泳分离。此法的特点是时间短，样品量也较少，特别适用于纸层析较难分离的四种核苷酸的分离。

核苷酸可以解离的基团有磷酸基， $-NH_3^+$ 和烯醇基。其中各核苷酸磷酸基(一级和二级解离)解离差异不大。另外只有尿苷酸和鸟苷酸有烯醇基，且解离差异也不大。而胞苷酸和腺苷酸又没有此基团。所以电泳分离最好是利用各核苷酸的氨基解离差。由表 4.7 可以看出，在 pH3.5 左右，各核苷酸的氨基解离差最大，是电泳分离的最适 pH。即在 pH3.5 时，各核苷酸氨基带正电荷离子化程度分别是 CMP 0.89 (pK4.24)、AMP 0.54 (pK3.56)，GMP 0.06 (pK2.3)，UMP 0 (没有氨基)。在 pH3.5 时各核苷酸的磷酸基一级解离已完全，带上一个负电荷，磷酸基二级解离尚未进行，结果各核苷酸所带的净负电荷各为 UMP-1，GMP-0.94，AMP-0.46，CMP-0.11 (见下表)

表 4.7 四种核苷酸在 pH3.5 时离子化程度以及净负电荷

核苷酸名称	氨基 (NH_3^+) 解离的 pK 值	离子化程度	净负电荷
UMP	—	—	1.00
GMP	2.30	0.06	0.94
AMP	3.56	0.54	0.46
CMP	4.28	0.89	0.11

所以电泳时,各核苷酸向正极移动速度 $UMP > GMP > AMP > CMP$ 。

操作步骤

1. 缓冲液的配制 称取柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 16.2 克,柠檬酸三钠, ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) 6.7 克加蒸馏水使溶解,最终体积为 2000 毫升,即成 pH3.5 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。将上述缓冲液加到电泳槽内,使二边槽内的液面高度一致。

2. 配制四种单核苷酸标准液(AMP、GMP、CMP、UMP) 浓度为 5 毫克/毫升(以水作溶剂)。

3. 点样

(1) 滤纸大小为 30×10 厘米,距离纸端 10 厘米处划一基线,从基线的中点开始向左右两侧间隔 1.5 厘米作一记号,共 5 点,标上应点溶液的符号。

(2) 点样,用毛细管将被测液和标准样品 AMP、GMP、CMP、UMP,分别点于滤纸上,每一种样品均点 2—3 次左右,点的直径小于 2 毫米。

4. 电泳 用喷雾器将电泳缓冲液均匀细密地喷于纸上,点样处最后喷,然后将滤纸平整地放在电泳槽的滤纸架上,纸二端垂于缓冲液中,盖上电泳槽盖子,平衡 5 分钟,接上电极,调电压为 300V,室温通电 2 小时半(注意点样端为负极,切勿接取)。

5. 烘干 电泳完毕后,关闭电源,取出滤纸,平放在玻璃架上,于 $80^\circ C$ 烘箱内烘干或用电吹风吹干。

6. 紫外光灯下观察及成分鉴定 将滤纸放于紫外光灯下观察分离情况,用铅笔画出各斑点的位置,被测样品与标准核苷酸对照,确定为哪种核苷酸。

7. 结果讨论 从纸电泳层析谱可以看出各单核苷酸在电场中移动的距离大小,其次序为 $UMP > GMP > AMP > CMP$ 。(图 4.5)

(二) 琼脂糖凝胶电泳分离核苷酸^[29]

为了使电泳时间更缩短,且使核苷酸类物质分得更好,可采用高压电泳和琼脂糖凝胶电泳。琼脂糖凝胶电泳是以琼脂糖凝胶作为支持物,分离鉴定效果好,需时短,一般分离 AMP、ADP、ATP 只需 8—10 分钟,分离腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶和它们相应的核苷、核苷酸、核苷二磷酸、三磷酸只需 15 分钟,可以用作定性,也可以定量。

原理

分离核苷酸的原理与纸电泳相同,但经比较,在 pH3.1 的缓冲系统中分离比 pH3.5 的效果好。

试剂

(1) 核苷酸溶液: 四种标准单核苷酸溶液 10 毫克/毫升。

(2) 0.05M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH3.1。

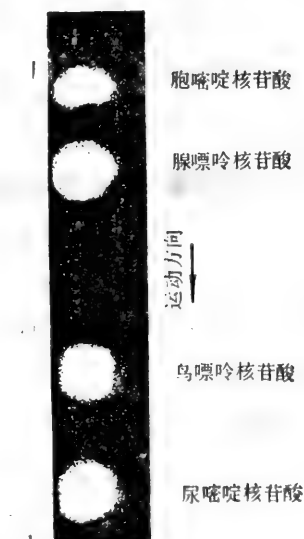


图 4.5 RNA 碱水解液四种核苷酸纸电泳谱示意图。

(3) 洗脱液 0.05N NaOH 溶液。

(4) 0.4% 琼脂糖凝胶板。

称取琼脂糖 0.4 克,溶于 50 毫升蒸馏水中,溶解后,另取 50 毫升 pH3.1, 0.05M 柠檬酸缓冲液,加热 60℃,趁热与前者混匀,即得 0.4% pH3.1, 0.025M 柠檬酸缓冲液的琼脂糖溶液。

操作步骤

1. 制板 将 9 × 10 厘米玻片平置于事先用水平仪校正水平的平板玻璃上,吸取 14—15 毫升琼脂糖溶液,平铺于玻片上,静置 10—20 分钟让琼脂糖凝结。

2. 电泳 在电泳槽中倒入 pH3.1, 0.05M 柠檬酸缓冲液,使二边电泳槽中液面在同一水平面上,将制好的琼脂糖凝胶板平放于电泳槽中,凝胶板的表面与电极槽缓冲液的液面越接近越好,在凝胶板二端分别搭上用缓冲液浸湿的四层滤纸,滤纸的另一头浸入缓冲液,作为电桥。

把新华层析滤纸(4号)或华脱门3号滤纸用刀片裁成宽约1.5毫米,长约8毫米的小条,用微量注射器吸取每种单核苷酸溶液10微升及待测液10微升,分别点到滤纸小条上(共点五条滤纸小条),用眼科镊子将蘸有样品的小纸条嵌入琼脂糖凝胶板上负极一边8毫米处,每块小纸条之间的距离是1.5厘米左右,注意在嵌入时不使小纸条歪斜,然后接通电源,调节电压为300伏,进行电泳,电泳时间约10分钟左右,电泳完毕后关闭电源,取出凝胶板在紫外光灯下观察结果,用特种铅笔在凝胶背面圈出紫外吸收的斑点,与标准单核苷酸对照,确定四种核苷酸在电场中移动距离的大小,其次序为:UMP > GMP > AMP > CMP。

若需定量测定,在紫外光灯下,用不锈钢小刀轻轻将各核苷酸区带划开,在其近旁划开同样大小的凝胶块作为对照的空白区带,把划开的各核苷酸区带及空白区带分别放到试管中,加入5毫升0.05N NaOH洗脱液,洗脱30分钟后,清液在紫外分光光度计中于260毫微米测定其光密度,根据其在0.05N NaOH中各核苷酸的克分子消光系数即可计算其含量,计算方法可参照前面核苷酸的纸上层析法部分。

(三) 琼脂糖凝胶圆盘电泳分离 ECoRI 酶解 λ DNA 片段^[20]

λ 噬菌体作为无性繁殖的载体有其很大的优越性,首先杂种分子可以大量制备,因为一个细菌细胞可以产生几百个 λ DNA 拷贝,并且作为噬菌体颗粒的组分杂种 DNA 易纯化,因此对 λ DNA 深入的研究,对进一步了解杂种 DNA 分子可能有很大帮助。

原理

大肠杆菌限制性内切核酸酶 ECoRI 对 λ 噬菌体 DNA 有五个酶切点,因此酶解后可生成六个 DNA 片段,当以琼脂糖凝胶作为电泳支持物时,被分离物质的电泳迁移率只与物质的分子大小有关,因此当 DNA 片段分子量不同时,即可获得分离。

利用溴乙锭(Ethidium Bromide)插入 DNA 后在紫外线照射下发出桔红色的强烈荧光可检出 DNA 各片段的区带相应位置。

试剂

- (1) λ DNA, 以蒸馏水配成每微升 0.5 微克溶液。
- (2) EcoRI, 以蒸馏水配成每微升 2.5 微克溶液。
- (3) TMN 缓冲液: 100mM Tris- 盐酸 (pH7.6), 5mM 氯化镁, 50mM 氯化钠配制而成。
- (4) 10TMN: 以上 TMN 缓冲液浓十倍。
- (5) 0.1% 明胶。
- (6) 溴酚蓝-蔗糖溶液: 每 1000 毫升水含 2 克溴酚蓝, 500 克蔗糖。
- (7) 电泳缓冲液: 0.089M Tris—0.089M 硼酸—2.5mM 乙二胺四乙酸二钠, pH8.5, 此缓冲液内每毫升含溴乙锭 0.5 微克。
- (8) 琼脂糖(生化试剂)。

操作步骤

1. EcoRI 酶切 λ DNA 向 10 微升 λ DNA 溶液(每微升含有 0.5 微克)中加 3 微升的 EcoRI 溶液(每微升含有 2.5 微克), 5 微升浓 TMN 溶液, 5 微升 0.1% 明胶溶液, 然后以 27 微升水补体积到 50 微升。此混合液于 37℃ 中保温 1 小时后, 75℃ 加热 15 分钟使酶失活。再加 10 微升溴酚蓝—蔗糖溶液于混合液内, 混匀备用。

2. 琼脂糖凝胶的制备 称取 0.2 克琼脂糖于小烧杯内, 加入 20 毫升电泳缓冲液, 于沸水浴内加热搅拌至完全溶解, 用蒸馏水校正至总体积为 20 毫升。取洗净的 0.6×15 厘米玻璃管数支, 一端以橡皮塞封住, 用滴管将 60 至 80℃ 的琼脂糖溶液注入玻管内, 琼脂糖凝结后, 用尼龙纱布包住每个管子的顶部并用橡皮圈扣紧, 然后颠倒这凝胶管, 除去橡皮塞, 让凝胶从玻管口稍许滑出一些, 用刀片切去上端不平的凝胶而成一平坦的表面, 让凝胶向下滑入玻管内并贴在尼龙纱上。

3. 琼脂糖凝胶管的安装及上样 将琼脂糖凝胶管垂直插入上电极槽底板的橡胶塞孔中, 使凝胶管在孔上部分刚可见到凝胶层顶端, 注意橡皮塞孔必须密封不漏。

在上下二电极槽中装放电泳缓冲液, 琼脂糖凝胶管两端必须浸没在缓冲液内。

用微量注射器吸取已加溴酚蓝—蔗糖溶液的 λ DNA 酶解液 10 微升, 小心缓慢地加到凝胶顶部的缓冲液下, 另取一微量注射器吸取 2 微升 λ DNA 溶液(预先以 λ DNA 溶液: 溴酚蓝—蔗糖溶液 = 5:1v/v 混和)加入凝胶上作为对照。

4. 电泳 接通电源, 调节电压至 60 伏特, 室温电泳 4 至 5 小时后关闭电源, 取出凝胶管。

5. 结果鉴定 小心让琼脂糖凝胶从玻管内滑出, 置于紫外层析灯下观察电泳结果, 记下有桔红色荧光 λ DNA 各片段的分布位置。

第五节 组织中核酸含量的测定

一、组织材料的预处理

无论用那种方法测定某一生物材料中的核酸含量, 都需要对材料进行预处理。因为

生物材料中除含核酸外,还含有如磷蛋白、糖类、磷脂、核苷酸类辅酶及其他游离核苷酸等物质,会干扰核酸的测定。

预处理的一般方法是: 先将某种生物组织(新鲜组织立即使用最为理想,否则可在 -10°C 保存)在冰水中磨成匀浆,然后以冰冷的10%三氯乙酸(TCA)抽提2—3次,离心除去上清液,这样处理可将所有酸溶性杂质(包括核苷酸类的小分子化合物)除去。余渣以80%乙醇或无水乙醇抽提一次,乙醇-氯仿(3:1)抽提二次,乙醇-乙醚(3:1)抽提一次,乙醚抽提一次。经过这样处理,可将类脂质化合物除去,得到不溶于水的非脂化合物。然后可用下述二种方法中任何一种方法来测定 RNA 和 DNA。

(一) Schneider 测定法(酸处理法)

将上述经过预处理不溶于酸的非脂化合物部分用5%三氯乙酸或6%过氯酸在 90°C 抽提15分钟,无论是 RNA 或 DNA 都成为酸溶性物质而抽提出来,此酸提取液能用苔黑酚法和二苯胺法进行糖的颜色反应,分别测定 RNA 和 DNA 的含量,无蛋白质干扰的危险。

此法的优点是迅速简单,主要缺点是没有把 RNA 和 DNA 分开,只能从核糖和脱氧核糖的特殊颜色反应来推算,而这类反应象定糖法所述有许多干扰因素,测得数值不十分正确。

(二) Schmidt 和 Thannhauser 法(碱处理法)

将上述经预处理后不溶于酸的非脂化合物部分用0.3—0.5N KOH 或 NaOH 在 37°C 保温处理,使 RNA 降解为核苷酸,而 DNA 不受影响,在这过程中,部分磷蛋白的磷分解为无机磷。因此用酸中和后,再加冷的三氯乙酸(TCA)或过氯酸(PCA),使最后浓度为5—10%,DNA 随降解的蛋白质沉淀下来,离心分离,沉淀中含有 DNA,上清液为来自 RNA 的核苷酸,因此可分别用定磷法来测定 DNA 和 RNA。

本法主要优点是能把 DNA 和 RNA 分开,可以分别用定磷、定糖法来测定它们的含量。主要缺点是上清液除来自 RNA 的核苷酸外,尚有其他含磷化合物(如磷蛋白),因此用定磷法分析所得数据往往偏高。

二、大白鼠肝组织核酸含量的测定

(采用 Schmidt-Thannhäuser-Schneider 改良法^[21,22]简称 STS 法的修改法。)

试剂

(1) 20% TCA: 100 克三氯醋酸加蒸馏水 500 毫升。

10% TCA: 50 克三氯醋酸加蒸馏水 500 毫升。

(2) 无水乙醇。

(3) 氯仿: 甲醇 (2:1)。

(4) 乙醚。

(5) 0.3N KOH。

(6) 0.1N HCl 6N HCl。

(7) 5% PCA: 7.1 毫升 70% 过氯酸溶液加蒸馏水 92.9 毫升。

操作步骤

1. 核酸的抽提及 RNA、DNA 的分离

(1) 组织磨碎和酸溶性杂质的去除:

(a) 大白鼠打空气针于心脏, 立即死亡, 剖腹取出肝组织, 放入搁于冰水上的小烧杯中。

(b) 剪碎肝组织, 称取 1 克, 于匀浆器中加冷蒸馏水 5 毫升, 研磨成匀浆。

(c) 加 20% TCA (冷) 5 毫升, 搅匀后在 0—4℃ 3000 转/分, 离心 20 分钟, 上清液必需澄清, 弃上清液。

(d) 沉淀物中加冷 10% TCA 10 毫升, 搅匀后, 3000 转/分冷冻离心 25 分钟。上清液澄清, 弃去。

(2) 脂质的去除:

(a) 沉淀物加冰水 1 毫升, 搅成糊状。

(b) 缓慢加入 8—10 毫升无水乙醇(冷), 成均匀悬浊液, 0—4℃ 3000 转/分, 离心 10 分钟。

(c) 沉淀物再加入 8—10 毫升无水乙醇(冷)成均匀悬浊液, 0—4℃ 3000 转/分, 离心 10 分钟。

(至此的操作都要在 0—4℃ 进行, 以后的操作可以在室温进行。)

(d) 沉淀物加 8—10 毫升氯仿-甲醇 (2:1) 成均匀悬浊液, 3000 转/分, 离心分离之。

(e) 重复 (d) 步骤一次。

(f) 沉淀物中缓慢加入 8—10 毫升乙醚, 成均匀悬浊液, 3000 转/分, 离心分离之。

(g) 重复 (f) 步骤一次。

(h) 于 30—40℃ 水浴中将沉淀物中的乙醚充分除去成淡黄色粉末。

(3) RNA 的分离:

(a) 粉末状沉淀物中加 0.3N KOH, 匀浆器中磨碎, 成糊状, 共加 0.3N KOH 10 毫升。

(b) 37℃ 水解 90 分钟, 液面有气泡出来, RNA 水解成核苷酸。(加入 KOH 碱液后, 如果是均一的溶解状态, 37℃ 90 分钟就够了, 否则可延长时间至 18 小时。)

(c) 碱水解后每 0.3N KOH 10 毫升加 6N HCl 1.65 毫升充分搅拌后, 冷却使沉淀完全, 离心分离之, 上清液为已降解成核苷酸的 RNA 部分, 沉淀中含有 DNA 和蛋白质。

(d) 沉淀物再悬于 0.1N HCl 8.35 毫升中, 离心分离之。

(e) 合并上二步上清液, 每 1 克湿重肝组织加 0.1N HCl, 定容至 20 毫升, 这是降解为核苷酸的 RNA 部分。

(4) DNA 的分离:

(a) 抽提去 RNA 的沉淀物悬浮于 20 毫升 5% PCA 中, 95℃ 水解 15 分钟。

(b) 离心分离后, 上清液为 DNA 部分。

2. RNA 和 DNA 含量的测定 可以用下列任何一方法测定

(1) 紫外吸收法: 得到的核酸部分用紫外吸收法测定, 按核酸 10 微克/毫升 $OD_{260} = 0.286^*$ 进行计算, 有 TCA 法及 PCA 法, 本处用 PCA 法, 因为 TCA 有紫外吸收。

(a) RNA 含量的测定: 取 RNA 分离部分 0.5 毫升, 加 5% PCA 9.5 毫升, 沸水浴中水解 15 分钟。以 5% PCA 为空白测 OD_{260} 值。RNA (微克/毫升) = $\frac{OD_{260} \times 10 \times 110}{0.286 \times 0.5}$

(b) DNA 含量的测定: 取 DNA 分离部分 1 毫升, 加 5% PCA 2 毫升或 4 毫升, 以 5% PCA 为空白测 OD_{260} 值。DNA (微克/毫升) = $\frac{OD_{260} \times 10 \times 3 \text{ (或 5)}}{0.286}$

(2) 定糖法:

(a) RNA 的测定。取定容至 20 毫升的 RNA 分离部分原液 0.5 毫升加 5% PCA 9.5 毫升 (稀释 20 倍)。取 1 毫升按改良苔黑酚法测定 RNA 的含量 (操作步骤及标准曲线的制作详见前面苔黑酚法), 然后根据稀释倍数计算出每克肝组织中 RNA 的毫克数。

(b) DNA 的测定。取定容至 20 毫升的 DNA 分离部分原液 1 毫升, 加 5% PCA 2 毫升 (稀释 3 倍), 取 1 毫升按改良二苯胺法测定 DNA 的含量 (操作步骤及标准曲线的制作详见改良二苯胺法)。

(3) 定磷法: RNA 与 DNA 的测定:

(i) 消化: 取 RNA 分离部分原液 5 毫升, DNA 分离部分原液 10 毫升, 分别于克氏管中微火加热浓缩至 1 毫升左右, 冷却后加约 50 毫克催化剂 ($CuSO_4 \cdot 5H_2O : K_2SO_4 = 1:4, w/w$), 1 毫升浓 H_2SO_4 , 微火加热, 样品由褐色至淡黄色, 稍冷, 加 30% H_2O_2 2 滴, 促进其氧化, 继续加热消化至透明, 稍冷, 加 1 毫升水在 100℃ 加热 10 分钟以分解消化过程中形成的焦磷酸。

(ii) 定磷试剂: 6N H_2SO_4 : 2.5% 钼酸铵: 水: 10% 抗坏血酸 = 1:1:2:1 (v/v)。

取上述定容至 10 毫升的消化液 0.5 毫升, 按定磷法分别测定 RNA 与 DNA 的量 (操作步骤及标准曲线的制作详见定磷法)。

根据上述方法测定了大白鼠肝组织 RNA 与 DNA 的含量。每克肝组织含有 8—9 毫克 RNA, 2—3 毫克 DNA。RNA 与 DNA 的比值为 3.5 左右, 回收率在 70% 左右。(回收率测定时, 在测定样品同量的组织中加入已知量的 RNA 及 DNA, 一般加入相当于组织中所含有的 RNA 和 DNA 的量。)

表 4.8 某次实验测定值

稀 释 倍 数*	OD_{260}	相当微克/毫升核酸	原液中核酸微克/毫升	核酸毫克/克肝组织
RNA I × 20 II × 20	0.550	19.23	384.6	7.69
	0.480	17.14	342.8	6.85
DNA I × 5 II × 3	0.720	25.2	126.0	2.52
	1.270	44.4	133.0	2.66

* 稀释倍数按核酸含量而定。

* 通常从 STS 法得到的核酸部分所选用的消光系数。

附录 常用核酸类物质的常数表

名称	分子量	熔点	溶解度	pH	λ_{\max}	$\epsilon \times 10^{-3}$ ϵ_{\max}	λ_{\min}	$\epsilon \times 10^{-3}$ ϵ_{\min}	$\epsilon \times 10^{-3}$ ϵ_{260}	250/ 260	280/ 260	290/ 260	一般性质
腺嘌呤	135.1	360	水中: 25°C—0.09 100°C—2.5 溶于酸碱, 微溶于 乙醇, 不溶于乙醚, 氯仿	1—3 6—8 0.01N NaOH	262.5 260.5 269	13.15 13.35 12.3	229 226 237	2.55 2.55 3.35	13.0 13.3 10.45	0.76 0.76 0.57	0.375 0.125 0.60	0.035 0.005 0.025	用 HNO ₃ 脱氨 成次黄嘌呤, 稀 酸水解 DNA 而 释放出。
鸟嘌呤	151.1	360	溶于酸碱, 极微溶 于乙醇, 不溶于水 及有机酸	1—2 7 246 11 246 1N NaOH	275.5 248.5 275.5 273.5 246 274	7.35 11.4 8.15 8.0 6.3 9.9	267 262 255 240	7.15 7.05 6.05 5.15	8.0 7.2 6.4 7.3	1.37 1.42 0.985 0.805	0.84 1.04 1.134 1.24	0.49 0.54 0.585 0.605	用 HNO ₃ 脱氨 成黄嘌呤, 与许 多酸碱形成结晶 盐, 盐酸化合物 含一份水。在 pH1 与 11 紫外 灯下有明显蓝荧 光, 在 pH7 时这 种荧光极少。
胞嘧啶	111.1	320— 325	水中: 25°C—0.77 微溶于乙醇, 不溶 于乙醚	1—3 7—10 14	276 210 267 282	10.0 9.7 6.13 7.86	238 247 250		6.0 5.55 2.35	0.48 0.78 0.595	1.53 0.58 3.28	0.78 0.08 2.6	100°C 失去结晶 水。溶于次氯酸 钠中产生红色并 使 NH ₄ OH 的 滴定数增加。
胸腺嘧啶	126.1	318— 321	水中: 25°C—0.404 溶于热水, 微溶乙 醇, 极微溶于乙醚	1—7 207 12—13	264.5 207 291	7.89 9.5 5.44	233 244	1.9 2.2	7.4 3.7	0.67 0.65	0.53 1.31	0.09 1.41	
尿嘧啶	112.1	335	水中: 25°C—0.36 溶于碱, 极微溶于 乙醇, 不溶于乙醚	2—7 14 6N HCl	259.5 284 260	8.20 6.15 7.80	227 241 229	1.8 2.1 1.5	8.2 4.1 7.80	0.84 0.71 0.795	0.175 1.40 0.30	0.01 1.27 0.05	
次黄嘌呤	136.1	150	水中: 19°C—0.07 100°C—1.4 溶于稀酸碱	4—7 11 1.2N HCl 1N NaOH	249.5 258.5 248 262.5	10.7 11.05 10.8 11.45	221 232 215 233	2.55 3.75 1.7 3.5	7.9 10.95 7.35 11.3	1.32 0.84 1.45 0.705	0.092 0.124 0.04 0.19	0.010 0.007 0.000 0.007	用 1N H ₂ SO ₄ 或 10N NaOH 处 理 1 小时, 被破 坏量少于 5%。
黄嘌呤	152.1		水中: 20°C—0.05 100°C—0.2 溶于碱, 微溶于乙 醇, 不溶有机溶剂	2—6 10 240.5 6N HCl 230.5 1N NaOH	267 277.5 240.5 260 230.5 284	10.25 9.3 8.9 9.15 6.35 9.4	240 257 242 257	2.7 5.0 5.2 3.6	8.85 5.2 9.15 3.75	0.565 1.29 0.765 1.11	0.61 1.71 0.15 2.39	0.07 0.92 0.005 2.27	用 1NH ₂ SO ₄ 或 10N NaOH 处理 1 小时后, 被破 坏的少于 10%。
乳清酸	156.1	345	水中: 18°C—0.18	1—2 4—7.2 12—13 14	205 280 207 278.5 286 289	10.9 7.52 11.6 7.68 5.98 5.35	240	0.9	4.2 4.5 3.35 2.4	0.55 0.57 0.79 0.81	1.80 1.71 1.73 2.00	1.55 1.38 1.73 2.23	
腺苷	267.2	234— 235	溶于水, 极微溶于 乙醇	1—2 7—12	257 259.5	14.6 14.9	230 227	3.5 2.25	14.3 14.9	0.84 0.78	0.215 0.144	0.03 0.002	在真空中 100°C 失去结晶水, 在 稀无机酸中迅速 被水解成 A 与 D 核糖, 被 HNO ₃ 脱氨成肌苷。

续 表

名称	分子量	熔点	溶 解 度	pH	λ_{\max}	$\epsilon \times 10^{-3}$ max	λ_{\min}	$\epsilon \times 10^{-3}$ min	$\epsilon \times 10^{-3}$ 260	250/ 260	280/ 260	290/ 260	一般性质
鸟 苷	283.2	240	水中: 18°C—0.08 100°C—3.0 溶于稀无机酸, 碱热 冰醋酸, 不溶于乙 醚, 乙醇, 氯仿苯	1 7 11	256.5 252.5 258— 266	12.2 13.65 11.3	228 223 231	2.4 2.8 4.1	11.75 11.7 11.3	0.94 1.15 0.89	0.695 0.67 0.61	0.50 0.275 0.13	在稀无机酸中易 水解成 G 和 D- 核糖, 在 pH1 时 紫外灯下有蓝荧 光, 在碱性时无 荧光, 用 HNO_2 脱氨成黄嘌呤核 苷。
胞 苷	243.2	212— 215	溶于水, 微溶于乙 醇	1—2 7—12	280 271	13.4 9.1	241 250		6.4 7.55	0.45 0.86	2.10 0.94	1.58 0.34	
尿 苷	244.2	163.5 —166	溶于水, 微溶于乙 醇	1—7 11—12	262 262	10.1 7.45	231 237	2.0 4.5	9.95 7.35	0.74 0.83	0.35 0.29	0.03 0.02	将胞苷用 HNO_2 脱氨制取
肌 苷	268.2	218	水中: 20°C—1.6 极微溶于乙醇	3—6 2N HCl 11.2	248.5 251 253	12.25 10.9 13.1	223 — 224	3.4 — 2.5	7.1 9.0 11.7	1.68 1.21 1.05	0.25 0.11 0.18	0.025 0.000 0.008	在稀无机酸中易 水解成 I 和 D- 核糖
黄 苷	284.2			2 — 7 — 8—11	263 235 277 248 278 248.5	8.95 8.4 — — 8.9 10.2	248 217 — — 264 222	6.4 3.9 — — 7.0 2.8	8.7 — — 7.9 7.65	0.75 — — 1.29 1.30	0.28 — — 1.10 1.13	0.03 — — 0.58 0.61	
乳清酸 核苷	288.2	大于 400	溶于水, 乙醇	2 12	267 267	9.57 7.6	234 245	2.6 5.7		0.65 0.82	0.79 0.72		易被稀无机酸水 解
脱氧 腺苷	251.2	186— 189	溶于水	2	258	14.1				0.83	0.24		易被稀酸水解, 其氢氧化物真空 80°C 失去结晶水
脱氧 鸟苷	267.2	300— 1	溶于水	1 7	255	12.1		230	2.2	11.3 11.75	1.02 0.99	0.70 0.61	易被稀无机酸水 解
脱氧 胞苷	227.2	199— 201	溶于水	1—2 7—12	280 271	13.2 9.0	241 250		6.15 7.35	0.42 0.83	2.14 0.965	1.61 0.305	
脱氧胸 腺苷	242.2	186— 187		1—7 12—13	267 267	9.65 7.38	235 240		8.75 6.65	0.65 0.75	0.72 0.67	0.235 0.16	
脱氧 尿苷	228.2	167	溶于甲醇、水	1—7 11—12	262 262	10.2 7.63	231 242	2.2 5.3	10.1 7.55	0.72 0.81	0.375 0.31		
5'- AMP	347.2	196— 200	溶于热水	2 7—12	257 259	15.0 15.3	230 227	3.5 2.6	14.5 15.3	0.84 0.79	0.22 0.15	0.038 0.009	用 20% HCl 回 流时仅产生少量 糠醛
5'- GMP	363.2	190— 200		1 7 11	256 252 258	12.2 13.7 11.6			11.6 11.7 11.5	0.96 1.16 0.90	0.67 0.66 0.61		
5'- CMP	323.2	233		1—2.5 6—12	280 271	13.2 9.1	241 250		6.3 7.4	0.45 0.84	2.10 0.99	1.55 0.33	
5'- UMP	324.2	198.5		2—7 11 12	262 261	10.0 7.8			9.9 7.7 7.3	0.73 0.83 0.82	0.39 0.31 0.33	0.03 0.02 0.02	

续 表

名称	分子量	熔点	溶解度	pH	λ_{\max}	$\epsilon \times 10^{-3}$ m_{\max}	λ_{\min}	$\epsilon \times 10^{-3}$ m_{\min}	$\epsilon \times 10^{-3}$ ϵ_{260}	250/ 260	280/ 260	290/ 260	一般性质
5'-ATP	507.2			2 7—11	257 259	14.7 15.4	230 227	3.5 2.5	14.3 15.4	0.85 0.80	0.22 0.15	0.027 0.003	用 1N HCl 100℃ 处理 10 分钟 66% 磷酸酯以无机磷形式被释放出, 中性的钠盐或钾盐在 -15℃ 溶液状态稳定几个月, 在 0℃ 约稳定一周。0℃ 处于 7% 三氯醋酸条件下只稳定几小时, 在碱性溶液中 0℃ 也被分解成无机焦磷酸酯和 5'-AMP。
5'-IMP	348.2		溶于水, 甲酸, 极微溶于乙醇、乙醚	2 7 11	249 248 254	11.7 12.3 12.3			7.5 11.4	1.59 1.63 1.09	0.22 0.23 0.20		用稀酸水解成黄嘌呤核糖 5 磷酸、D-核糖, 无机磷。
5'-dAMP	331.2			2 7—12	258	14.8			14.5 15.3	0.82 0.80	0.23 0.14	0.007	单钙盐含二份结晶水, 白色无定形固体, 易被稀无机酸水解。
5'-dGMP	347.2			2 4.3—7					11.7 12.8	1.03 1.13	0.70 0.67	0.46 0.27	单钙盐含 4 份水, 易被稀无机酸水解。
5'-dCMP	307.2	183—184		1—2.5 6—12	280	13.2	241 250		6.3 7.4	0.46 0.82	2.12 0.99	1.55 0.30	
5'-dTMP	322.2	175		1—7 12	267 207	9.9 9.5			9.0 6.9	0.65 0.74	0.72 0.67	0.23 0.17	

参 考 资 料

- [1] Kirby, K. S., Progress in Nucleic Acid Research, **3**, 1(1964).
- [2] Marmur, J., J. Mol. Biol., **3**, 208(1961).
- [3] Kirby, K. S., Biochem. J., **96**, 226(1965).
- [4] Davidson, J. N. and Smellie, R. M. S., Biochem. J., **52**, 600(1952).
- [5] Albaum, H., Umbreit, W., J. Biol. Chem., **167**, 2, 369(1947).
- [6] Мейбаум, В., Биохимия, **10**, 4, 353 (1945).
- [7] Schjeide, O. A., Anal. Biochem., **27**, 473—483 (1969).
- [8] E. 查可夫, J. N. 达维生著, 黄德民译, 核酸(第一卷), 科学出版社, (1963).
- [9] Abraham, G. N. et al., Anal. Biochem., **49**, 547(1972).
- [10] Wiener, S. L., Anal. Biochem., **71**, 579(1976).
- [11] Тихоненко, Т. И., Современные Методы в Биохимии. ил. «Медицина» **1**, 233 (1964).
- [12] 中国科学院生化所二室结构分析组. 生物化学与生物物理学报 **7**(2), 199(1975).
- [13] 钦俊德, 生物科学参考资料, 第四集, 34 页 (1974).
- [14] Schildkraut, C. L. et al., J. Mol. Biol., **4**, 430(1962).
- [15] Marmur, J. & P. Doty., J. Mol. Biol., **5**, 109(1962).
- [16] 汪迺经, 孙册, 任世宜. 生物化学与生物物理学报 **5**, (1), 55(1965).
- [17] 工业微生物科技情报站, 上海市工业微生物研究所, 工业微生物学, 1973 年增刊, 13 页。
- [18] Cohn, W. E., The nucleic acid Vol. **1**, 22(1955).
- [19] 上海化工学院工业生化专业, 核酸及有关知识(第二期生化药物短训班讲义), 上册 3—43(1975).
- [20] Marjorie Thomas Ronald W. Davis, J. Mol. Biol., **91**, 3, 315(1975).
- [21] 須田治彦等, 生物の科学遺伝, **30**(4), 76, (1976).
- [22] J. N. 达维生著, 核酸的生物化学, 科学出版社 100 页(1963).

第五章 维生素类

王诚一 马 明

维生素是有机化合物,是人类及动物在正常生长和维持生命中不可缺少的物质。动物本身一般不能合成这些化合物,或者合成量不足,必须从食物中摄取,否则会产生营养缺乏病。

维生素与人类所需的三大类营养物质——碳水化合物、脂肪和蛋白质不同,它既不是构成机体组织的原料,也不能给机体提供能量,然而在调节机体的新陈代谢和能量变化方面起着重要作用,许多维生素参与辅酶的组成。机体对维生素所需的量极小而维生素的功效极大。

维生素的种类很多,根据溶解性能的不同,可分为脂溶性及水溶性两大类。维生素A、D、E和K等属于脂溶性维生素,B族维生素及维生素C、P等属于水溶性维生素,它们的化学结构及生理功能各不相同。本章主要介绍维生素A、B₁、B₂、B₆、C和D的定量测定方法。

一、维生素A比色测定法^[1]

原理

维生素A在氯仿溶液中能与三氯化锑反应生成蓝色物质,颜色之深浅与溶液中所含维生素A的量成正比,此蓝色不甚稳定,必须在一定时间内用分光光度计于620毫微米波长下测定其强度^[1]。

试剂

1. 氢氧化钾溶液 称取500克氢氧化钾,溶解于500毫升蒸馏水中。
2. 乙醚 需用不含过氧化氢的试剂,以免维生素A被破坏。乙醚应预先检查是否含有过氧化氢^[2],如含有过氧化氢必须重蒸馏。
3. 乙醇 乙醇应经脱醛处理。脱醛方法:取2克硝酸银溶于少量蒸馏水中;取4克氢氧化钠溶于温乙醇中;将两者倾入1升乙醇中,振摇均匀,静置一、二天;取上层清液

-
- 1) 据报导^[1]用三氯醋酸代替三氯化锑作显色剂测定维生素A,可得相同结果,并具有毒性小,配制使用方便等优点。三氯醋酸溶液制备如下:取50克三氯醋酸(AR)溶于25毫升新蒸馏的无醇氯仿中(现用现配)。测定时加样品提取液(制作标准曲线时用维生素A标准液)1毫升,然后加三氯醋酸溶液2毫升,在620毫微米波长下测定光密度(6秒钟内)。其他各项操作均与三氯化锑法相同。
 - 2) 检验乙醚中过氧化氢的方法:取5毫升乙醚于试管中,加约1毫升50%碘化钾溶液,振摇1分钟,如果乙醚中含有多量过氧化氢,则将KI中的碘氧化,放出游离碘,水层呈黄色。如无明显黄色,可加一滴1%淀粉溶液,如有过氧化氢则水层显蓝色。

蒸馏。蒸出液的最初 50 毫升弃去。脱醛乙醇应作含醛检验¹⁾。

- 4. 无水硫酸钠 粉状,纯净。用过的可经熔化、再结晶,回收使用。
- 5. 酚酞指示剂 1 克酚酞溶于 100 毫升 95% 乙醇中。
- 6. 氯仿 氯仿的分解物²⁾可破坏维生素 A,所以应预先检查,如有,则将氯仿置分液漏斗中,用水洗数次。此后,加无水硫酸钠或氯化钙脱水,然后再蒸馏。
- 7. 20—25% 三氯化锑氯仿溶液 20—25 克三氯化锑溶于 100 毫升氯仿中,储于棕色瓶内,并尽量减少吸收水分的机会。
- 8. 醋酸酐
- 9. 维生素 A 醋酸酯或维生素 A 标准油剂

操作步骤

维生素 A 极易为光所破坏,实验应在暗室中进行。

- 1. 制作维生素 A 标准曲线
 - (1) 配制标准溶液: 精确称取一定量的标准维生素 A,放在量瓶中以氯仿溶解,再用氯仿稀释至不同浓度,分别移取氯仿或各种不同浓度的标准液 1 毫升于相应的比色管中,每管加醋酸酐一滴。
 - (2) 显色及比色: 将 10 毫升氯仿装入一个比色管中,插入比色架的一个孔中。再将盛有 1 毫升氯仿(试剂空白),或不同浓度的标准液的比色管插入比色架的另一孔中。将盛有 10 毫升的氯仿液管先放置于光道下,于 620 毫微米波长下调节光密度至零。立即将另一比色管移入光道,迅速加入 9 毫升三氯化锑氯仿溶液³⁾,在 6 秒钟内测定光密度,以光密度为纵座标,维生素 A 的含量(国际单位)为横座标,画出标准曲线。下表为一次实验数据的例子:

比色管	维生素 A 含量(国际单位)	光密度	光密度(减去试剂空白后)
1	0	0.020	0
2	7.8	0.131	0.111
3	14.6	0.241	0.221
4	24.3	0.383	0.363
5	29.2	0.455	0.435
6	38.9	0.560	0.540
7	48.6	0.673	0.653
8	58.4	0.790	0.770

- 2. 样品分析 根据样品的性质,可分别采取皂化法和研磨法。

- 1) 检验乙醇中含有醛的方法: 于试管中加入 2 毫升氧化银氨液(加浓氨液于 50%AgNO₃ 中直至氧化银的沉淀重新溶解,加入 10%NaOH 数滴,如发生沉淀,再加浓氨液使其溶解)。加几滴蒸出的乙醇摇匀,加入少量 10%NaOH 加热,如乙醇中无醛,则没有银沉淀,否则有银镜反应。
$$RCHO + 2AgOH + NH_4OH \rightarrow RCOONH_4 + 2Ag \downarrow + 2H_2O$$
- 2) 氯仿分解物的检验法: 氯仿不稳定,易受空气中氧的作用生成氯化氢和光气。
$$2CHCl_3 + O_2 \rightarrow 2HCl + 2CCl_2O$$

检查时可取少量氯仿于试管中,加水少许振摇之,使 HCl 溶于水层,加几滴 AgNO₃ 液,如有白色沉淀即说明氯仿中有分解产物。
- 3) 使用过三氯化锑的器皿或试管洗涤时,应先用盐酸,然后再用水洗,如有白色沉淀产生,须再用盐酸洗。因三氯化锑易水解而生成不溶于水的白色沉淀。
$$SbCl_3 + 2H_2O \rightarrow SbOCl \downarrow + H_2O + 2HCl$$

(1) 皂化法: 适用于维生素 A 含量不多的样品; 可减少维生素 A 以外的脂溶性物质的干扰, 但全部操作过程较长, 易造成维生素 A 的损失。

(a) 皂化: 根据维生素 A 在样品中含量的不同, 精确称取 0.5—5 克样品, 放在三角瓶中, 加入 10 毫升 50% 氢氧化钾和 20—40 毫升乙醇, 在电热板上迴流 30 分钟, 至皂化完全为止。

【注意】 (i) 所取样品应有代表性, 若样品是从冰箱中取出的鱼肝油, 先暖至室温, 摇振均匀后取样。

(ii) 迴流时间因样品而异, 检查皂化是否完全, 可以加少量水于皂化瓶中, 振摇后如有混浊现象, 表示皂化未完全, 应继续加热。皂化完毕时以 10 毫升水冲洗冷凝管, 洗液并入皂化瓶内, 然后冷却至室温。

(iii) 所用氢氧化钾溶液中所含氢氧化钾的量至少为样品的一半。

(b) 提取: 将皂化瓶内混合物移至分液漏斗内。用 30 毫升水洗皂化瓶, 洗液并入分液漏斗内(如有渣子, 应过滤); 用 50 毫升乙醚分两次洗皂化瓶, 乙醚洗液并入分液漏斗内。振摇分液漏斗, 静置, 待两层液体完全分清后, 将水层放入第二个分液漏斗内(摇动时不应过猛, 以免出现乳状, 难于分离, 万一遇到此情况, 可加数毫升乙醇, 若无效, 可再加数毫升水即可分开)。再用乙醚 30 毫升分两次冲洗皂化瓶, 醚洗涤液倾入第二个分液漏斗中, 摇动, 静置, 弃去水层。醚层放入第一分液漏斗中。重复 1—2 次至水液中无维生素 A 为止¹⁾。

(c) 洗涤: 用约 30 毫升水洗涤第一分液漏斗中的醚提取液, 弃去水层。取 15—20 毫升 0.5N 氢氧化钾溶液加入分液漏斗中, 轻轻振摇, 弃去碱层。(经此洗涤后可除去醚溶性酸皂)。继续用水洗涤提取液, 每次用水约 30 毫升, 直至最后洗涤液与酚酞指示剂无颜色反应为止。

(d) 蒸发醚液: 将醚提取液经无水硫酸钠滤入 300 毫升三角瓶内, 再用约 25 毫升醚液冲洗分液漏斗及硫酸钠两次, 并入三角瓶内。将三角瓶放在水浴上蒸馏, 回收醚液, 待瓶内剩约 5 毫升时取下并减压抽干, 抽干后立即加氯仿, 以免维生素 A 在干燥状态时被氧化破坏, 氯仿的加入量使溶液中维生素 A 的含量达到每毫升 10—30 国际单位。

(e) 显色及比色: 取几个比色管, 第一管中加入 10 毫升氯仿和一滴醋酸酐。第二管中加入 1 毫升氯仿, 其余比色管分别加入 1 毫升样品溶液; 并各加一滴醋酸酐。如同制作标准曲线一样进行比色, 记录光密度, 然后根据光密度值从标准曲线上计算出每毫升样品溶液所含维生素 A 的量。

(2) 研磨法: 适用于维生素 A 含量高的样品, 其优点是: 步骤简单、省时间、准确。如维生素 A 含量少于 5—10 微克/克时, 不宜用此法, 因在此情况下, 其他脂溶性物质会干扰显色, 当加入三氯化锑时发生混浊。

(a) 精确称取 2—5 克样品, 置于研钵内, 加入相当于样品重量 3—5 倍的无水硫酸钠。细心研磨至样品中的水分完全被吸收, 两者混匀为止。

(b) 小心将磨干的样品混合物移入带玻塞的锥形瓶内, 准确加入 50—100 毫升乙醚, 压紧盖子, 用力摇动 2 分钟, 使样品中的维生素 A 全部溶于乙醚中。

(c) 将锥形瓶放入冰水中 1—2 小时, 直至乙醚液澄清为止。

(d) 准确吸取乙醚提取液 2—5 毫升, 放入比色管中, 在 70—80℃ 水浴上抽气蒸干,

1) 检验样品中维生素 A 是否提净的方法: 取最后一次醚提取液 2 毫升于试管中, 加少许三氯化锑。如无蓝色反应, 说明维生素 A 已提净。一般样品中含有维生素 A 11,000 国际单位时用 40 毫升乙醚提取 5—6 次即可。样品含量低者提取 3—4 次即可。

立即加入氯仿 1 毫升溶解残渣。随即加入醋酸酐一滴和 9 毫升 25% 三氯化铋氯仿溶液混匀。在 6 秒钟内测定其光密度。根据光密度值从标准曲线上查得测定管中所含维生素 A 国际单位数,并计算出样品所含维生素 A 的量。空白管的测定同皂化法。

计算

【例 1】样品 2 克,皂化提取液蒸干后,溶于 5 毫升氯仿,吸 1 毫升氯仿液作比色测定,从标准曲线上查得此液每毫升含有维生素 A 23.4 国际单位。

$$\text{每 100 克样品中含维生素 A} = 23.4 \times 5 \times \frac{100}{2} = 5.850 \text{ 国际单位}$$

【例 2】取肝样品 2 克与硫酸钠研磨后以 100 毫升乙醚提取,取 2 毫升乙醚液,蒸干后,溶于 1 毫升氯仿中比色。从标准曲线上查知此液每毫升含有 10 国际单位。

$$\text{每 100 克样品中含维生素 A} = 10 \times \frac{100}{2} \times \frac{100}{2} = 25,000 \text{ 国际单位}$$

二、维生素 B₁ (硫胺素) 荧光测定法^[1.3.4]

原理

硫胺素在碱性铁氰化钾溶液中可被氧化生成一种蓝色荧光化合物——硫色素。在标准条件下,如果不存在其他荧光物质,溶液的荧光强度与硫胺素的浓度成正比。如果样品中含杂质过多,应经离子交换剂处理,使硫胺素与杂质分开。

仪器

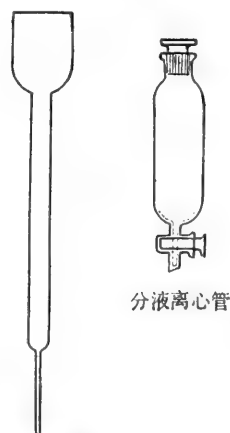
- (1) 盐基交换管: 长 80 毫米,内径 8 毫米,上有 50 毫升容量钟形罩(图 5-1)。
- (2) 分液离心管: 25—30 毫升(图 5-1)。
- (3) 荧光计: Coleman 12 型。

试剂

- (1) 无水硫酸钠。
- (2) 15% 氢氧化钠溶液: 取 15 克氢氧化钠溶于水中,稀释至 100 毫升。
- (3) 1% 铁氰化钾溶液: 1 克铁氰化钾溶解于蒸馏水,定容至 100 毫升,置至棕色瓶,冷藏暗处保存。
- (4) 碱性铁氰化钾溶液: 取 1 毫升 1% 铁氰化钾溶液,以 15% 氢氧化钠稀释至 15 毫升,现用现配,避免阳光照射。
- (5) 0.1N 硫酸溶液: 稀释 2.8 毫升浓硫酸(比重 1.84)至 1000 毫升。
- (6) 0.1N 盐酸溶液: 8.5 毫升浓盐酸(比重 1.19)用蒸馏水稀释至 1000 毫升。

(7) 2.5M 醋酸钠溶液: 205 克无水醋酸钠加蒸馏水定容至 1000 毫升。

(8) 丁醇: 114—118℃ 重蒸丁醇;也可用异丁醇。



盐基交换管

分液离心管

图 5.1 盐基交换管和分液离心管

(9) 淀粉酶溶液: 可取用高峰淀粉酶 (Takadiastase) 和淀粉酶制剂 (Diastase)。当天配制成 2% 酶溶液或用 2.5M 醋酸钠溶液配成酶悬浮液。

(10) 25% 氯化钾溶液: 取 250 克氯化钾溶解于水中, 稀释至 1000 毫升。

(11) 25% 酸性氯化钾溶液: 取 8.5 毫升浓盐酸(比重 1.19) 以 25% 氯化钾溶液稀释至 1000 毫升。

(12) 0.1 毫克/毫升硫胺素储备标准液: 将硫胺素(粉状结晶)置于氯化钙干燥器中 24 小时。精确称取 100 毫克溶于 25% 乙醇或 0.01N 盐酸中, 稀释至 1000 毫升, 冷藏, 5℃ 以下可保存数月。

(13) 0.1 微克/毫升硫胺素标准液: 将储备液稀释一千倍, 以冰醋酸调至 pH4.5, 现用现配。

(14) 95% 乙醇。

(15) 3—5% 醋酸: 将 30 毫升冰醋酸以水稀释至 1000 毫升。

(16) 0.1 毫克/毫升硫酸奎宁储备液: 100 毫克硫酸奎宁溶于 0.1N 硫酸中, 稀释至 1000 毫升, 放入棕色瓶中, 保存在冰箱内, 若溶液变浑, 应重配。

(17) 0.15 微克/毫升硫酸奎宁溶液: 将 1.5 毫升硫酸奎宁储备液以 0.1N 硫酸稀释至 1000 毫升。此液可用标准荧光玻璃代替。

(18) 活性人造沸石: 使用 30—50 目及 60—80 目的混合物, 若溶液中含量高于 7 微克时, 可用 60—80 目。

人造沸石活化或再生: 100 克人造沸石, 以 10 倍于其容积的热 3% 醋酸搅拌二次, 每次 10 分钟; 再用五倍容积的热 25% 氯化钾搅拌 15 分钟; 用热 3% 醋酸搅拌 10 分钟; 然后, 用热蒸馏水洗至无氯离子为止; 最后放在布氏漏斗中抽干, 100℃ 以下烘干, 保存在密封的广口瓶中。若处理后活力不高, 重复处理, 或增加 25% 氯化钾处理的次数。

若人造沸石含有大量的铁时, 可用酸性氯化钾洗涤。

人造沸石的活力不稳定, 活力随贮存而降低。使用前必须试验其吸附硫胺素的能力。要求硫胺素的回收率达 92% 以上。

操作步骤

1. 提取

(1) 精确称取一定量磨细的样品(硫胺素含量在 10—30 微克之间), 置于 100 毫升锥形瓶中, 加入 75 毫升 0.1N 盐酸, 在沸水浴上加热半小时, 时常摇动, 使之均匀。(根据经验, 蔬菜、水果、鱼类可取样 15—20 克, 谷类、肉类 2—5 克, 豆类、干果类 5—10 克)。

(2) 用 2.5M 醋酸钠溶液调至 pH4.5 (用溴化甲苯酚绿为外指示剂)。

(3) 提取液冷却至室温, 为了使结合性硫胺素呈游离状态加入淀粉酶混悬液。(酶的用量: 动物性食品和干植物样品, 每克加 20 毫克, 新鲜蔬菜水果, 每克样品加 3 毫克), 37℃ 下保温过夜(为防止杂菌的生长, 在液面上盖一层甲苯), 或 45°—50℃ 保温 3 小时。

(4) 冷却至室温, 用水稀释至 100 毫升, 混均匀后过滤, 弃去最初的几毫升。

2. 纯化

(1) 将人造沸石装入盐基交换管中, 体积约占管长 1/3, 用蒸馏水洗。

(2) 吸取 25 毫升提取液, 加入到已准备好的盐基交换管内, 提取液通过沸石的速度

为 60 滴/分左右,加入提取液量的多少,根据其中硫胺素的浓度而定,使硫胺素的总量在 2—5 微克之间。

(3) 用热水洗盐基交换管三次,每次大约用 10 毫升,弃去洗液。

(4) 用约 10 毫升热酸性氯化钾洗脱,待完全滤下后,再加 10 毫升。收集洗脱液于 25 毫升容量瓶中,冷却后,用酸性氯化钾液稀释至刻度。

(5) 取 25 毫升 (0.1 微克/毫升) 硫胺素标准溶液,加入另一准备好的盐基交换管中,重复 (3), (4) 步纯化标准硫胺素溶液。

3. 氧化

(1) 取两个分液离心管,标明“测定”及“空白”。各准确加入 5 毫升提取液。

(2) 在测定管内加入 3 毫升碱性铁氰化钾液,在空白管内加入 3 毫升 15% 氢氧化钠溶液。

(3) 两管内各加入 15 毫升丁醇,并剧烈振荡 90 秒钟。

(4) 用标准硫胺素滤出液代替提取液,重复上述操作三步 [(1), (2), (3)]。

(5) 将上述 4 个分液离心管离心,使丁醇与碱液分层清楚。

(6) 小心将各管的下层碱液弃去,并各加 1—2 克无水硫酸钠,摇匀,离心。

4. 测定

用萤光计分别测定各管丁醇提取液的荧光度(用硫酸奎宁应用液校正荧光计,使电流指针位于一定数字上)。

计算

$$\frac{T_u - B_u}{T_s - B_s} \times 0.1 \times \frac{25}{V} \times \frac{100}{W} = \text{每克样品内所含硫胺素量(微克)}$$

T_u = 样品溶液的发光度,

B_u = 样品空白液的发光度。

T_s = 标准溶液的发光度,

B_s = 标准空白溶液的发光度,

W = 样品的重量(克),

V = 所用已提纯的样品量(毫升)。

三、维生素 B₂ (核黄素) 荧光测定法^[1,5]

原理

核黄素能形成一种具有黄绿色荧光的黄色溶液。它在稀溶液中, 440—500 毫微米波长下测定的荧光强度与核黄素的浓度成正比。根据其在还原前后的荧光差数, 可测得核黄素的含量。

试剂

1. 3% 高锰酸钾溶液 将高锰酸钾 3 克溶于水, 稀释至 100 毫升, 每星期配制一次。

2. 核黄素标准液 (0.5 微克/毫升) 取储备液 (25 微克/毫升) 1 毫升, 稀释至 50 毫

升,临用时配制。

3. 荧光红钠储备溶液 (50 微克/毫升) 50 毫克荧光红钠溶于 1000 毫升水中。

4. 荧光红钠应用液 (0.05 微克/毫升) 1 毫升储备液稀释至 1000 毫升。

5. 硫代硫酸钠 固体,粉末状。

6. 冰醋酸

核黄素标准液及荧光红钠应用液的浓度因荧光计而异。

操作步骤

1. 样品提取

(1) 称取含有核黄素约 5—10 微克的均匀样品于 125 毫升锥形瓶中,加入 50 毫升 0.1N HCl,置于 15 磅高压下蒸煮 30 分钟。

(2) 样品经高压处理后,冷却,用氢氧化钠调至 pH6.0。(因核黄素在碱性溶液中不稳定,所以必须滴加碱液,边加边摇,避免局部碱性过强。)再迅速用 1N HCl 调至 pH4.5,使杂质沉淀。

(3) 用水稀释至 100 毫升,过滤。如果样品量大,可过滤后稀释,样品稀释度由所用标准液浓度来定。

2. 滤液酸化

(1) 取两个试管(A),分别加入 10 毫升滤液和 1 毫升水。

(2) 另取两个试管(B),分别加入 10 毫升滤液和 1 毫升核黄素标准液 (0.5 微克/毫升)。

(3) 以上四个管各加 1 毫升冰醋酸。

3. 纯化

(1) 每个试管各加入 0.5 毫升 3% 高锰酸钾,混匀后放置 2 分钟以充分氧化样品内的杂质。

(2) 另取两个试管(c),分别加入 10 毫升滤液和 1 毫升水及 1 毫升冰醋酸,然后向两试管中各加入 20 毫克 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 用量不宜多加,以免影响荧光度。)使样品中的杂质与核黄素都还原成无荧光物质,再摇动,使核黄素与空气接触而被氧化,测其荧光。

(3) 在 A, B 管内各加 0.5 毫升 3% H_2O_2 (H_2O_2 不宜加过量,以免产生气泡,影响荧光读数)混匀,10 秒钟内退去颜色。

4. 荧光测定

(1) 用荧光红钠溶液调整指针,使之每次都在一定的读数上(如 50—80)。

(2) 滤液加水的荧光读数为 A。

(3) 滤液加标准液的荧光读数为 B。

(4) 滤液内加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 的荧光读数为 C。

计算

$$\frac{A - C}{B - A} \times \frac{\text{标准溶液(微克/毫升)}}{10 \text{ 毫升滤液}} \times \text{稀释倍数} \times \frac{1}{\text{样品重量}} = (\text{微克/克})$$

四、维生素 B₆ (盐酸吡哆醇)比色测定法^[6,7]

原理

维生素 B₆ 与 2, 6 二氯醌氯亚胺反应生成蓝色醌酚, 在 650nm 处具有最大吸收, 维生素 B₆ 含量在 3—8 微克/毫升时符合比尔定律。

试剂

1. 2, 6 二氯醌氯亚胺溶液 取 2, 6 二氯醌氯亚胺 40 毫克溶于 100 毫升异丙醇。贮存于冰箱可在一个月内使用, 如果变成粉红色不可再用。

2. 氢氧化铵-氯化铵缓冲液 16 克氯化铵溶于 70 毫升蒸馏水, 加浓氨水 16 毫升, 再用蒸馏水定容至 100 毫升, 过滤后使用。

3. 标准维生素 B₆ 贮备液 (0.1 毫克/毫升) 精密称取盐酸吡哆醇标准品 25 毫克 (预先在硅胶真空干燥器中干燥 4 小时), 溶解于 250 毫升 0.1N 盐酸中, 装在棕色瓶内置冰箱中保存 (可稳定三个月)。

4. 标准维生素 B₆ 应用液 (10 微克/毫升) 吸取标准维生素 B₆ 贮备液 10.0 毫升, 用蒸馏水稀至 100 毫升。(当天配制使用。)

5. 浓盐酸、0.1N 盐酸

6. 异丙醇

7. 20% 醋酸钠溶液

8. 5% 硼酸溶液

操作步骤 (以片剂为例)

(1) 取不少于 20 片的盐酸吡哆醇片, 称重后研细, 精确称取相当于 10 毫克盐酸吡哆醇的片粉, 用少量水将片粉转移至 250 毫升锥形瓶中, 加盐酸 5 毫升, 然后用水定容至 250 毫升。在水浴上加热使之完全溶解。冷却后转移到 1000 毫升容量瓶中, 用水稀释至刻度, 混匀后取部分离心, 取其上清液进行测定。

(2) 取 5.0 毫升上清液于烧杯中, 加异丙醇 25.0 毫升, 混和后, 吸取 5.0 毫升置于 25 毫升带玻塞的刻度量筒或带玻塞的试管中, 依次加入氢氧化铵-氯化铵缓冲液 1.0 毫升、20% 醋酸钠溶液 1.0 毫升、水 1.0 毫升, 混匀, 冷却至 25℃ 左右。加 2, 6 二氯醌氯亚胺溶液 1.0 毫升, 猛烈振摇 10 秒钟, 从加入此溶液起计时, 60 秒钟后立即在 650nm 波长处测其吸收值, 记录读数 A_u (时间过长会使颜色消退产生误差)。

(3) 重复操作 2, 但以 1.0 毫升 5% 硼酸溶液代替 1.0 毫升蒸馏水。记录读数 A'_u。

(4) 重复操作 2, 但以 5.0 毫升标准盐酸吡哆醇溶液代替 5.0 毫升上清液。记录读数 A_s。

(5) 重复操作 4, 但以 1.0 毫升 5% 硼酸溶液代替 1.0 毫升水, 记录读数 A'_s。

计算

所取片剂供试量中盐酸吡哆醇的毫克数 = $10 \times \frac{A_u - A'_u}{A_s - A'_s}$

其中 10 为预计片剂供试量中盐酸吡哆醇的毫克数。

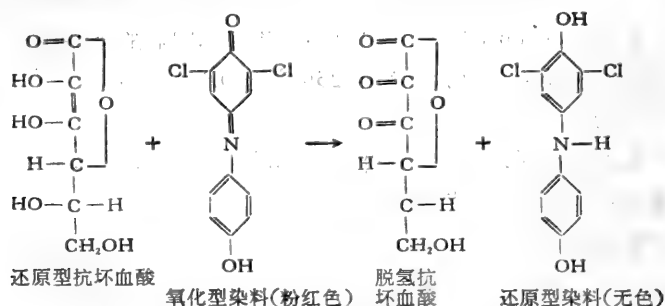
五、维生素 C (抗坏血酸) 定量测定法

维生素 C (抗坏血酸) 是一种略有酸味的白色结晶体, 它容易溶解于水 (100 毫升可溶解 33 克), 但在溶液中容易氧化为脱氢抗坏血酸, 氧化后仍具有维生素 C 的生理活性, 但它容易分解为二酮古洛糖酸, 这时不再具有维生素 C 的生理活性。

(一) 2, 6 二氯酚靛酚滴定法^[1, 3]

原理

还原型抗坏血酸具有还原性, 能将染料 2, 6 二氯酚靛酚还原成无色, 而抗坏血酸本身被氧化成脱氢抗坏血酸。



氧化型的 2, 6 二氯酚靛酚在酸性溶液中呈粉红色, 在中性或碱性溶液中呈蓝色。当用此染料滴定含有抗坏血酸的酸性溶液时, 在抗坏血酸未全部氧化前, 则滴下的染料立即被还原成无色, 一旦溶液中的抗坏血酸全部被氧化时, 则滴下的染料即使溶液显示粉红色, 此时为滴定终点, 即表示溶液中的抗坏血酸刚刚被氧化完全。

试剂

1. 2% 草酸 溶解 20 克草酸(化学纯, 结晶)于 700 毫升重蒸水中, 定容至 1000 毫升。

2. 1% 草酸 将 2% 草酸溶液稀释之。

3. 标准抗坏血酸溶液 (0.02 毫克/毫升) 取 20 毫克标准抗坏血酸结晶溶解于 1% 草酸中, 稀释至 100 毫升, 再取其中 5 毫升稀释到 50 毫升, 迅速取 5 毫升标定染料。

4. 0.02% 2, 6 二氯酚靛酚溶液 取 50 毫克 2, 6 二氯酚靛酚溶解于约 200 毫升含有 52 毫克碳酸氢钠的热水中。冷却后稀释至 250 毫升。过滤后装在棕色瓶内贮于冰箱中。每星期至少标定一次。

标定方法如下: 取 5 毫升标准抗坏血酸溶液加 5 毫升 1% 草酸, 用 0.02% 2, 6 二氯酚靛酚滴定, 以溶液的粉红色能维持 15 秒钟为终点。所用的 2, 6 二氯酚靛酚溶液的体积相当于 0.1 毫克抗坏血酸, 由此可求出 1 毫升溶液相当于抗坏血酸多少毫克 (T)。

操作步骤

1. 提取

(1) 称 100 克样品,加 100 克 2% 草酸,倒入捣碎机中打成均匀浆状。若测动物样品则可用 10% 三氯醋酸作为提取剂。如测含有大量 Fe^{++} 的食物,可用 8% 醋酸溶液为提取剂。

(2) 称取 10—30 克浆状样品(含有抗坏血酸 1—5 毫克)置于 100 毫升量瓶中,以 1% 草酸稀释至 100 毫升。

(3) 将此稀释的样品液过滤,弃去最初几毫升滤液。如果滤液色深可用白陶土脱色。
2. 滴定

(1) 用吸量管吸取 5—10 毫升(含样品 w 克)滤液,放入 50 毫升锥形瓶内。如果样品中抗坏血酸含量过低,每一百克中含 5 毫克或低于 5 毫克时,可取 25 毫升滤液进行滴定。或仍用 10 毫升滤液,但将染料稀释为 0.01%。

(2) 立即用标定过的 2,6 二氯酚靛酚溶液滴定之,记下消耗的染料溶液毫升数 (V)。

计算

$$\frac{V \times T}{W} \times 100 = \text{抗坏血酸毫克数/100 克样品}$$

式中, V = 滴定时用去的染料溶液毫升数。

T = 1 毫升染料溶液所能氧化抗坏血酸的毫克数。

W = 滴定时所用滤液中所含样品的克数。

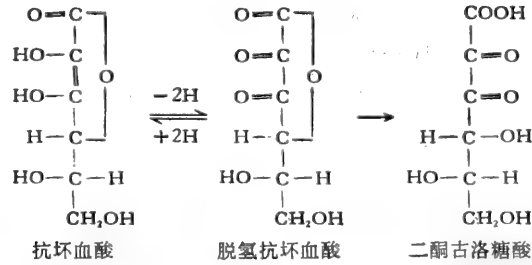
讨论

- (1) 操作要尽可能快,以减少抗坏血酸的被氧化。
- (2) 草酸及蔬菜的草酸提取液不要暴露在日光下,以免加速抗坏血酸的氧化及破坏。

(二) 2,4 二硝基苯肼法^[1,3]

原理

总抗坏血酸包括还原型,脱氢型和二酮古洛糖酸。将样品中的还原型抗坏血酸氧化成脱氢型抗坏血酸。在 pH5 以上时,脱氢抗坏血酸发生分子重排,其内脂环裂开生成二酮古洛糖酸。



脱氢抗坏血酸和二酮古洛糖酸都能与 2,4 二硝基苯肼作用生成红色的脎。脎的含量与总抗坏血酸含量成正比。将脎溶于硫酸后,进行比色,由标准曲线计算样品中的总抗坏血酸含量。

试剂

1. 9N 硫酸 取浓硫酸(比重 1.84) 25 毫升慢慢倾入 70 毫升蒸馏水中,冷却后定容至 100 毫升。

2. 2% 2, 4-二硝基苯胂溶液 取 2 克 2, 4-二硝基苯胂溶于 100 毫升 9N 硫酸中,过滤,放置冰箱内,每次使用前必须过滤。

3. 2% 草酸 取 20 克草酸(化学纯,结晶)溶于 700 毫升蒸馏水中,稀释至 1000 毫升。

4. 1% 草酸 将 500 毫升 2% 草酸稀释至 1000 毫升。

5. 1% 硫脲 取 5 克硫脲溶于 500 毫升 1% 草酸中。

6. 2% 硫脲 取 10 克硫脲溶于 500 毫升 1% 草酸中。

7. 85% 硫酸 取 900 毫升浓硫酸(比重 1.84)小心加入 100 毫升蒸馏水中。

8. 标准抗坏血酸溶液 取 100 毫克纯抗坏血酸溶于 100 毫升 1% 草酸中。

9. 活性炭 取 100 克活性炭,加 1N 盐酸 750 毫升,在沸水中迴流 1—2 小时。过滤,用蒸馏水洗涤数次至滤液中无 Fe^{+++} 为止,置烘箱内烘干备用。

操作步骤

1. 标准曲线的制作

(1) 取抗坏血酸标准液(1 毫克/毫升) 25 毫升于锥型瓶中,加活性炭 0.1 克,摇荡 1 分钟,过滤。

(2) 准确吸取滤液 10 毫升于 50 毫升容量瓶内,加入 0.5 克硫脲,待溶解后用 1% 草酸溶液稀释至刻度,混匀之(200 微克/毫升)。

(3) 另取 10 毫升容量瓶 5 个,编号。按次序分别加入上述稀释液 0.1 毫升, 0.2 毫升, 0.4 毫升, 0.8 毫升, 1.2 毫升,并各用 1% 硫脲液稀释至刻度,混匀之。各瓶内抗坏血酸的浓度分别为每毫升 2 微克, 4 微克, 8 微克, 16 微克, 24 微克。

(4) 取 6 个试管,其中一个加上述任一浓度抗坏血酸稀释液 4 毫升为“空白”管。其它五个试管编号为“测定”管,按次序分别加上述各种浓度抗坏血酸稀释液 4 毫升。

(5) 在每个“测定”管内加入 2% 2, 4-二硝基苯胂溶液 1 毫升,连同“空白”管一起置于 37℃ 温箱保温 3 小时。

(6) 3 小时后,将“测定”管置于冰水中,“空白”管冷至室温后加入 2% 2, 4-二硝基苯胂溶液 1 毫升,在室温下放置 10—15 分钟后再放在冰水中冷却。

(7) 在上述各管中慢慢滴加 85% 硫酸 5 毫升,边滴加边摇动试管,加完 5 毫升须用 1 分钟,这样可防止溶液因温度升高而变黑。

(8) 将试管从冰水中取出,在室温下放置半小时,然后在 490 毫微米波长下进行比色。

(9) 以光密度为纵坐标,抗坏血酸的浓度(微克/毫升)为横坐标,绘制抗坏血酸的标准曲线。

2. 样品中总抗坏血酸的提取

(1) 准确称取样品(如蔬菜或水果) 100 克和 2% 草酸液 100 克置于匀浆器内捣成匀

浆。

(2) 称取匀浆 10—40 克, 倾入 100 毫升量瓶内, 再用 1% 草酸洗涤数次并一起转入容量瓶中, 稀释至刻度。

(3) 充分混匀后立即过滤或离心。

3. 氧化成脱氢抗坏血酸, 成脌, 比色

(1) 吸取滤液 25 毫升, 加活性炭 0.1 克, 摇荡约 1 分钟, 使还原抗坏血酸氧化成脱氢抗坏血酸, 过滤。

(2) 准确吸取氧化后的滤液 10 毫升于一试管内, 并加 2% 硫脲 10 毫升, 混匀之。

(3) 取试管 2 个, 标明“空白”及“测定”各加入上述稀释液 4 毫升。

(4) 按照标准曲线制作项(5)一(8)操作, 使形成脌并进行比色。

计算

$$\frac{R}{W} \times \frac{100}{1000} = 100 \text{ 克样品内所含有总抗坏血酸毫克数。}$$

式中 R 表示从标准曲线查出的每毫升测定液中所含总抗坏血酸的微克数。

W 表示每毫升稀释液中所含样品克数。

讨论

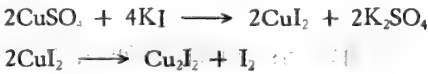
(1) 硫脲的作用在于防止抗坏血酸继续被氧化和有助于脌的形成。

(2) 加硫酸显色后, 可随时间的延长而加深, 因此必须掌握比色时间, 恰到半小时比色才较准确。

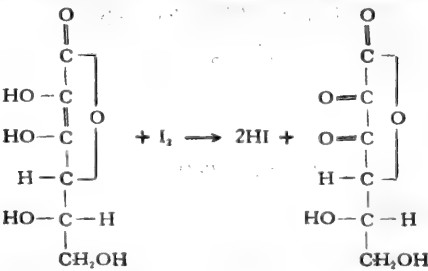
(三) 碘滴定法^[8]

原理

铜盐(硫酸铜或醋酸铜)与过量的碘化钾进行反应形成碘化铜, 碘化铜不稳定, 随即分解为碘化亚铜和游离的碘。



释放出来的碘可氧化 L-抗坏血酸形成脱氢抗坏血酸和碘化氢。反应继续进行, 直到溶液里的 L-抗坏血酸被碘全部氧化为止。剩余的微量的碘与淀粉指示剂生成蓝色, 终点



明显。本法简单, 快速, 可准确测定 L-抗坏血酸 25 微克的量。对抗坏血酸纯品进行测定的结果表明实验误差不超过 $\pm 2\%$ 。

试剂

(1) 标准 0.01M 硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶液或 0.01M 醋酸铜 [$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$] 溶液: 精确称取 0.2497 克硫酸铜或 0.1996 克醋酸铜加水定容至 100 毫升。

(2) 30% 和 50% 碘化钾水溶液 (w/v)。

(3) 1% 可溶性淀粉指示剂溶液 (w/v)。

(4) 偏磷酸-醋酸溶液: 取 15 克偏磷酸溶于 40 毫升冰醋酸和 450 毫升蒸馏水的混合液中, 在冰箱中过滤, 滤液保存在冰箱中, 超过 10 天需重新配制。

操作步骤

1. 测样准备

(1) 药品片剂: 取 10 个药片称重, 小心研碎, 精密称取相当于 1 片重量的片粉, 以偏磷酸-醋酸溶液溶解, 于 100 毫升量瓶中定容, 摇匀后过滤。

(2) 注射液: 取 1 毫升注射液用偏磷酸-醋酸溶液稀释定容到 100 毫升。

(3) 食品: 取 50 克或 20 克蔬菜或水果, 加偏磷酸-醋酸溶液到 200 毫升, 搅匀 3 分钟后过滤, 滤液放入碘量瓶中。

2. 滴定 精密量取一定体积的样品溶液(如 5 毫升)于 100 毫升碘量瓶中, 加 10 毫升 30% KI 溶液(抗坏血酸稀溶液含量低于 1 毫克时可用 50% KI 溶液)。再加数滴淀粉指示剂溶液。随即用标准硫酸铜溶液 (0.01M) 进行滴定。边滴定边振摇, 直至显示出蓝色, 记录滴定量。再做一个空白试验, 在计算前, 需将样品的滴定量减去空白试验的滴定量得 V 。

计算

$L\text{-抗坏血酸含量(毫克/每份)} = V \times C$

$V = 0.01M$ 标准硫酸铜溶液的毫升数。

$C = 0.88$, 即 1 毫升 0.01M 标准硫酸铜溶液相当于 0.88 毫克抗坏血酸。

六、维生素 D 比色测定法^[6,9]

原理

维生素 D_2 和 D_3 在氯仿溶液中与三氯化锑反应呈橙黄色, 在 500 毫微米处具有最大吸收。本法适用于维生素 D 各种制剂的测定。

试剂

1. 三氯化锑的重蒸 取分析纯的三氯化锑, 置于曲颈瓶内, 在砂浴上加热, 当三氯化锑开始蒸出时, 用表玻璃接取一滴馏出液, 若冷却后析出结晶, 即可将馏出液收集于预先称重的干燥、带玻塞的瓶内, 称重。

2. 氯仿的重蒸 将氯仿置于分液漏斗中, 加 5% (w/v) 硫代硫酸钠溶液振荡, 氯仿层用无水氯化钙脱水, 然后重蒸, 弃去首尾部分。

3. 三氯化铈-氯仿溶液 取上述重蒸的三氯化铈, 加入相当于其重量五倍的氯仿, 摇动使溶解。

4. 三氯化铈-乙酰氯-氯仿溶液 取上述三氯化铈-氯仿溶液, 加入相当于其体积的 3% 的乙酰氯, 摇匀, 此溶液可用五天。

5. 乙醚 取分析纯乙醚, 加 5% (w/v) 硫代硫酸钠溶液振荡, 取出乙醚层, 重蒸馏, 弃去首尾部分, 用碘化钾试液检查有无过氧化物。

6. 95% 乙醇 分析纯。

7. 50% 氢氧化钾溶液 取 50 克氢氧化钾, 加水至 100 毫升。

8. 维生素 D 标准溶液 精确称取骨化醇标准品 12 毫克, 用重蒸的氯仿溶解并稀释至 50 毫升, 此液保存在冰箱中可用 10 天。

9. 维生素 D 标准应用液 (12 微克/毫升) 取上述维生素 D 标准液 5 毫升用氯仿稀释至 100 毫升。此液现用现配。

操作步骤

1. 维生素 D 油注射液的测定

(1) 精确吸取样品 (每毫升含维生素 D 40 万单位) 1 毫升, 用氯仿稀释成每毫升约含维生素 D 12 微克。

(2) 取标准维生素 D 标准应用溶液和样品液各 1 毫升, 分置于两个比色杯中, 各加三氯化铈-乙酰氯-氯仿液 4 毫升, 摇匀, 在 500 毫微米处测定吸收值。呈色程度与温度有关, 一般情况下, 在 20℃ 时, 以加入显色剂后 1—2 分钟内测定为好。

按下式计算样品中维生素 D 的含量:

$$C_x (\text{微克/毫升}) = \frac{A_x}{A} \times C_s \times N$$

A_x = 样品溶液的吸收值,

A = 标准维生素 D 溶液的吸收值。

C_s = 标准维生素 D 的浓度 (微克/毫升)

N = 样品稀释倍数。

2. 维生素 D 胶性钙注射液 (每毫升含维生素 D 5 千单位) 的测定

(1) 精确吸取样品 1 毫升, 置于 125 毫升锥形瓶中, 加 95% 乙醇 30 毫升, 50% 氢氧化钾溶液 3 毫升, 接回流冷凝管, 在水浴上回流皂化 30 分钟, 自冷凝管顶端加 10 毫升蒸馏水, 冲洗冷凝管, 冷却。

(2) 将溶液移置于 250 毫升分液漏斗中, 锥形瓶再用蒸馏水洗数次, 每次用蒸馏水 15—20 毫升, 洗涤液合并入分液漏斗内。

(3) 用乙醚提取三次, 每次振摇 10—15 分钟, 共用乙醚 100 毫升。合并乙醚液。

(4) 用蒸馏水洗涤乙醚提取液, 每次用量 50—100 毫升, 慢慢摇动以免乳化, 直至水层遇酚酞指示液不再显红色。

(5) 乙醚液用铺有无水硫酸钠的漏斗过滤至锥形瓶内, 漏斗再用乙醚洗涤, 洗涤液并入锥形瓶中。

(6) 锥形瓶置于水浴上, 在低温下回收乙醚, 待样品蒸干后立即取下。再用电吹风吹

干,加入 10 毫升氯仿溶解之。

(7) 取标准液和样品液各 1 毫升,分置于两个比色杯内,各加入 4 毫升三氯化铋-乙酰氯-氯仿溶液,搅匀,在 500 毫微米波长处测定吸收值。用上述(维生素 D 油注射液的测定项下)公式,计算样品溶液中维生素 D 的含量。

讨论

(1) 操作要避光,蒸去乙醚时最后残留物要用氮气吹干,也可用电吹风热风吹干,最后残留的少量乙醚,只要不直接曝晒,影响不会太大。

(2) 使用本法进行测定时,维生素 A 会与三氯化铋反应形成蓝色产物而发生干扰,必须设法除去维生素 A。(可采用经皂化后的未皂化部分再经过二次层析除去维生素 A。也可将皂化后的未皂化部分通过氧化铝柱层析除去维生素 A)

参 考 资 料

- [1] 中国医学科学院劳动卫生、劳动保护及职业病研究所营养学系,食物营养成份测定法,1961,人民卫生出版社。
- [2] Bayfield, R. F., *Analytical Biochemistry*, 39, 282, (1971).
- [3] 彭伟堂,微量生物化学实验,1964,上海科学技术出版社。
- [4] Meloan, C. E. et al., *Food Analysis Laboratory Experiments*, Westport, Conny, The AVI Pub, (1973).
- [5] Hodson, A. Z. et al., *J. Biol. Chem.*, 131, 621, (1939).
- [6] 南京药学院,药物分析(下册)。
- [7] The United States Pharmacopeia, (18), 571.
- [8] Barakat, M. Z. et al., *Anal. Biochem.*, 53, 245, (1973).
- [9] Jacobs, M. B., *Chemical Analysis of Foods and Food Products*, Third Edition, (1958).

第六章 激 素 类

蒋谷人 李翠凤

激素是生物体内的一种调节物质,是多细胞生物在漫长进化过程中的产物。多细胞生物在进化过程中,一方面组织器官趋向高度分化,另一方面又形成高度协调一致的整体。动物能较好地适应环境,就是由于中枢神经和内分泌系统对机体的统一协调作用。内分泌系统是经过特殊分化而形成的组织,它所分泌的特殊化学物质直接进入血液,运送到有关效应器官,作用于靶细胞,协调机体各组织之间,机体内外环境之间的变化,从而调节代谢,这类由内分泌细胞产生的物质称为激素(Hormone)。

激素的作用是调节机体内一系列生化反应速度,以控制机体的代谢活动。特点是:数量小、效率高、作用大。激素分泌数量的多少,直接影响机体的代谢,甚至决定着机体的存亡。近代医学界,常利用测定激素以诊断疾病,服用或注射激素类药物以治疗疾患。如糖尿病患者,机体消瘦,血糖、尿糖偏高,这是由于患者胰岛素分泌量减少,血糖合成肝糖原的功能降低,注射胰岛素可使糖尿病得到治疗。又如测定尿中17-羟皮质类固醇(24小时尿)的含量可确诊下列病症:增高可能为柯兴氏综合症,肾上腺皮质腺瘤,或癌肿;减少可能为阿狄森氏病,西汉氏病等。

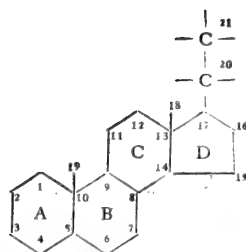
由于激素调节着多种复杂的代谢途径,因而激素的种类也是多种多样的。按其化学结构可以分为以下几类:一.含氮类激素包括蛋白质、多肽、氨基酸及其衍生物;二.甾类激素,或称类固醇激素;三.前列腺素及其它不饱和脂肪酸衍生物。随着激素种类的不同,其测定方法也不同。含氮类激素通常用生物测定法,放射免疫分析法,放射受体分析法。激素的一般纯度检查,用薄层层析、柱层析、气相色谱等方法,均可参阅本丛书其它分册。本章将着重阐述甾类激素的化学测定,包括紫外分光光度法、比色法等,供药检、临床生化、生化科研人员参考。

一、甾类激素——直接紫外分光光度法^[1-5]

直接紫外分光光度法广泛应用于甾类激素药物的原料测定。方法简便准确,但一般不适用于制剂。由于赋形剂往往在240毫微米附近有吸收,因此必须通过柱层析或薄层层析分离纯化后,才能进行紫外测定。

原理

甾类激素主要有肾上腺皮质激素和性激素,均具有环戊烷多氢菲母核。基本骨架为:



结构中A环多为脂环,少数为苯环(如雌激素),C₃上可能有羟基或羰基,C₁₀,C₁₃多数有甲基取代,C₁₁可能有羟基或羰基,C₁₇上的取代基(称为侧链)差别甚大,可为羟基,羰基,

甲基酮 ($\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—CH}_3$), α -醇酮基 ($\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—CH}_2\text{—OH}$) 等。

A环上 α , β 碳上不饱和双键及羰基的紫外吸收特性能够很好地用来测定具有该功能团的甾类。不饱和双键与羰基连接形成发色团系统,在230—270毫微米有吸收,而雌性激素A环的酚羟基在280毫微米有一吸收带(醇溶液中其克分子吸收 $\epsilon = 2000\text{—}2300$)。

表 6.1 甾类中各种发色团的紫外吸收特性

发色团紫外吸收特性			例 子		
结 构 名 称	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	ϵ_{max}	示 例	λ_{max}	ϵ_{max}
羰 基 (Carbonyl)	170—200	5000—10000		282	31
	280—300	50—100			
双 键 (Double bond)	180—225	500—5000		204	3300
α - β -不饱和酮 (α - β Unsaturated ketones)	230—270	10000—18000		253	11200
共轭双烯(不同环) (Conjugated dienes different rings)	220—260	14000—28000		232	21500
				239	23500
				248	16000
共轭双烯(同环) (Conjugated dienes same rings)	250—285	5000—15000		262	7700
				271	11400
				282	11900
				293	6900
共轭多烯 (Conjugated polyenes)	280—350	5000—20000		306	14500
二烯酮(不同环) (Dienones, different rings)	280—300	10000—30000		284	28000
三烯酮 (Trienones)	220—380	10000—30000		223	13500
				256	11900
				296	15300

仪器和试剂

- (1) 751 型分光光度计。
- (2) 无水乙醇 (C. P.)。
- (3) 激素标准品。

操作步骤

取一定量需要测定的甾类激素药物原料,用无水乙醇配成表 6.2 所示的浓度,在最大吸收波长下测出消光值,将此换算成 $E_{1cm}^{1\%}$ 时的消光系数,与下表列出的标准 $E_{1cm}^{1\%}$ 值进行比较,即可求出该样品中甾体激素的含量。或先用该激素的标准品,配制成一系列的浓度,测定其紫外吸收值,绘制标准曲线。测未知样品时可在曲线上直接查知其含量。

表 6.2 常用甾体激素的最大吸收波长及 $E_{1cm}^{1\%}$ 值

药 物 名 称	无水乙醇溶液	最大吸收波长(毫微米)	$E_{1cm}^{1\%}$
醋酸可的松	0.001%	238±1	390
氢化可的松	0.001%	242±1	435
醋酸氢化可的松	0.001%	242	385—405
醋酸泼尼松	0.001%	238±1	385
醋酸氢化泼尼松	0.001%	243±1	352—389
醋酸氟美松	0.0015%	240±1	355
氟美松磷酸钠	0.002%	242±1	294
醋酸氟氢可的松	0.001%	240	400
醋酸肤轻松	0.015%	240±1	332
苯丙酸诺龙	0.001%	240—242	430
甲基睾(甾)酮	0.001%	240	535
丙酸睾(甾)酮	0.001%	240	490
黄体酮	0.001%	241	540
己酸孕酮	0.001%	240	380—405
安体舒通	0.001%	238	485
安宫黄体酮	0.001%	240	405—430
苯甲酸雌二醇	0.001% 甲醇液	230	517
炔雌醇	0.01%	280±1	71
炔诺酮	0.001%	240±1	571
甲地孕酮	0.001%	288±1	630

如果甾类药物原料中含有“其它甾类”,必须先采用层析分离,然后用紫外分光光度法进行测定。下面列举数例说明紫外分光光度测定法的应用:

例 1: 美国药典 USP 对氟羟脱氢皮(甾)醇的含量测定 [USP(18) 742—743 页]就是先在硅胶-G (含荧光指示剂)板上分离洗脱后,再在 238 毫微米处测其吸收值。

例 2: 利用硅胶薄层分离和定量测定甾类混合物(泼尼松, 肤轻松及 Paramethason acetate) 层析溶剂为氯仿:丙酮 (70:30), 展开距离 10 厘米,采用紫外光定位,用 75% 甲醇水溶液洗脱吸收的斑点,然后用紫外分光法进行测定。回收率可达 96.0%±2.0%。

例3: 利用甾类激素间的结构不同,最大吸收波长不同,来进行纯度检查和含量测定。例如对口服避孕药异炔诺酮 (Norethynodrel) 进行炔诺酮限度检查时,由于二者双键位置不同,炔诺酮 Δ^4 -3 酮结构在 240 毫微米有最大吸收,而异炔诺酮双键位置在 5(10) 位,为

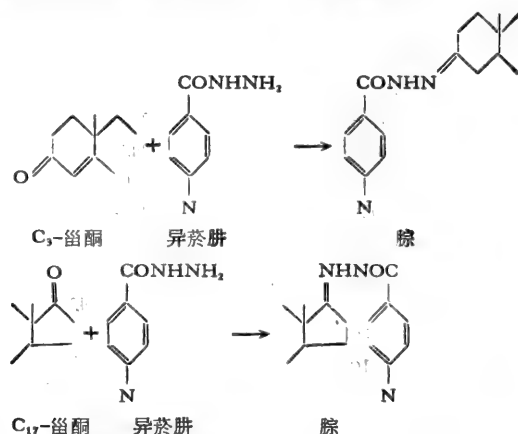
Δ^5 -3 酮, 在 240 毫微米处无最大吸收, 因此当异炔诺酮的 1:50000 无水甲醇溶液在 240 毫微米的吸收值如不大于 0.25, 就表明杂质限度合格。而当进行异炔诺酮含量测定时, 则用含盐酸的甲醇溶液在 25℃ 放置 1 小时, 使其异构化, 转变为具有 Δ^4 -3 酮基结构, 然后在 240 毫微米处测其吸收值, 计算其含量 [USP(18) 454 页]。

二、甾酮——异菸肼反应法^[1,6,7]

凡具有甾酮结构的激素类药物均可用本法测定。

原理

肾上腺皮质激素的 C_3 -酮基及某些甾酮基与常用的羰基试剂——异菸肼 (Isonicotinic acid hydrazide 简写 INH), 在弱酸性条件下形成异菸腙。某些具有两个甾酮基甾类激素可形成双腙, (如黄体酮, 可的松, 氢化可的松)。其反应如下:



以异菸肼为试剂, 在用盐酸酸化的无水乙醇介质中与 Δ^4 -3 酮基甾体快速形成醇溶性的浅黄色的腙。在 380 毫微米处有最大吸收。

本法可用于测定丙酸睾(甾)酮、黄体酮及其油溶液。还可用于甲基睾(甾)酮、可的松、氢化可的松等激素的测定。

仪器和试剂

751 分光光度计, 无水乙醇 (C. P.), 异菸肼 (C. P.), 盐酸 (C. P.), 无水 HCl, 异辛烷 (C. P.), (或正庚烷 C. P.), 氯仿 (C. P.), 硅藻土 (60—100 目), 无水甲醇 (C. P.), 激素标准品。

操作步骤

1. 异菸肼法

(1) 用于油溶液的含量测定步骤:

用校正过的注射器, 准确吸取一定量的甾体激素油溶液, 溶于无水乙醇中。(100 毫升醇中不得超过 1 毫升油。) 分取相当于 50 微克甾类醇溶液, 置于反应管中 (25×150 毫米

圆柱形磨口管)蒸去乙醇。加入 4 毫升异菸肼试剂(500 毫克异菸肼溶于含有 0.625 毫升浓盐酸的 100 毫升无水乙醇中)。加塞振摇或旋摇使样品充分溶解。在室温下放置 1 小时。以异菸肼试剂作空白,在 380 毫微米波长处测其吸收值。另取相当量的标准激素醇溶液(浓度为 100 微克/毫升无水乙醇溶液)同样处理测定,进行计算。

(2) 如果甾类激素在油溶液样品中含量为 10 毫克/毫升或更少时,则应作如下处理:精密量取一定量的甾类激素油溶液,溶于异辛烷-氯仿(2:1)混合溶剂中,使每 5 毫升溶剂中含 0.5 毫克甾类激素。

取 4.25 克佛罗里硅土(Florisil 60—100 目)用不含激素的混合溶剂 5 毫升油成浆状装柱。将含有 0.5 毫克甾类激素的混合溶液 5 毫升移入柱中。另以 100 毫升混合溶剂将样品展开。

如果样品为丙酸睾酮,以异辛烷-氯仿(1:1)200 毫升混合溶剂洗脱(或用正庚烷洗脱),蒸去溶剂,残渣以无水乙醇溶解。分取相当于 50 微克的甾类激素,在反应管中蒸干供测定用。

如果样品为黄体酮溶液,除同上操作外,不用异辛烷-氯仿(1:1)洗脱,而以 150 毫升氯仿洗脱,(或用正庚烷洗脱)。蒸干后供测定用。

(3) 标准曲线的制作: 精确称取标准甾类激素,如丙酸睾酮溶于异辛烷-氯仿(1:1),黄体酮溶于氯仿。配成一系列浓度,分置于 5 个反应管中,含量为 20、40、60、80、100 微克。水浴蒸干加入异菸肼试剂 4 毫升。室温暗反应 1 小时。在 380 毫微米处比色,制作标准曲线。

2. 异菸肼二盐酸法 $\Delta^{1,4}$ -3 酮甾类(如地塞米松)与 Δ^4 -3 酮甾类不同,它与异菸肼反应很慢。 Δ^4 -3 酮与异菸肼形成黄色的脎,仅在异菸肼与盐酸的克分子比为 1:2 时显色才稳定;而对 $\Delta^{1,4}$ -3 酮甾类来说,控制反应条件尤为需要,其呈色作用易受样品中碱性杂质的影响,因此结果重现性差。Kaito 提出以异菸肼二盐酸盐($\text{INH} \cdot 2\text{HCl}$,由异菸肼及干燥的氯化氢制得)代替异菸肼(INH)作为试剂,则受酸与异菸肼比率改变的影响减少。因此在混合制剂中测定 $\Delta^{1,4}$ -3 酮甾类,用 $\text{INH} \cdot 2\text{HCl}$ 法比 INH 法更为合适。

取 5 毫升甲醇试液(含 $\Delta^{1,4}$ -3 酮甾类 10—30 微克),加 5 毫升 0.2% (w/v) $\text{INH} \cdot 2\text{HCl}$ 试剂。(200 毫克 $\text{INH} \cdot 2\text{HCl}$ 加甲醇 90 毫升,加浓盐酸 0.075 毫升,加甲醇至 100 毫升)室温放置 2 小时。40°C 水浴保温 40 分钟,再冷却。以试剂为空白,在 407 毫微米处测吸收值。

表 6.3 列出一些甾酮与 $\text{INH} \cdot 2\text{HCl}$ 试剂作用产物的 λ_{max} 和 ϵ_{max} 数据。

计算

$\text{INH} \cdot 2\text{HCl}$ 法有两种计算方法:

- (1) 将测得的消光值除以克分子消光系数,乘以分子量,即为该样品的含量。
- (2) 取标准激素甲醇试液(浓度为标准 $\Delta^{1,4}$ -3 酮甾类 4 微克/毫升)5 毫升,加 0.2% (w/v) $\text{INH} \cdot 2\text{HCl}$ 试液(配法同前)5 毫升,反应时间,条件同前在 407 毫微米处测得消光值。用此值求出每毫升样品中所含的微克数。

表 6.3 甾酮异菸脞的最大吸收波长及克分子消光系数

化 合 物	λ_{\max}	ϵ_{\max}^*
$\Delta^{1,4}$ -3 甾酮类:		
地塞米松	407	17,300
泼尼松	407	16,300
雄甾烷-1,4 二烯-3,17 二酮	407	14,900
雄甾烷-1,4 二烯-3,11,17 三酮	407	15,700
17-羟基-雄甾烷-1,4 二烯-3 酮醋酸酯	407	16,200
17-二羟基-娠烷-1,4 二烯-3,11,20 酮	407	17,400
Δ^4 -3 甾酮类:		
氢化可的松	380	11,900
甲基睾(甾)酮	380	12,400

* 表观克分子消光系数

讨论

具有羰基的甾类,以弱酸性异菸脞试剂在无水乙醇中均可生成脞的衍生物。 Δ^4 -3 甾酮类在室温下约 1 小时即可定量反应,其它甾醇需在长时间放置或加热后方可反应完全。

盐酸在反应中不仅起到触媒作用,而且还使 Δ^4 -3 酮基异菸脞的吸收光谱发生移动,使其酸性醇液具有黄色,在 380 毫微米处具有最大吸收。但其它酮基(如雄甾酮)形成的脞没有这种特性。

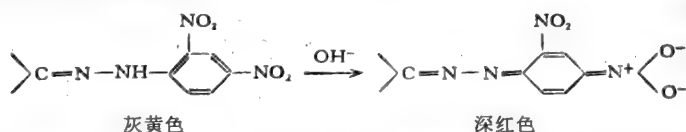
三、甾酮——2,4-二硝基苯脞反应法^[1,8,9]

凡具有甾酮结构的激素均可用本法作定量测定,包括甾类激素的药物原料和注射液,如黄体酮、睾(甾)酮、甲基睾(甾)酮以及可的松、雄甾酮等。

原理

2,4-二硝基苯脞在酸性介质中能与甾类激素上酮基反应,形成脞。在低温及短时间反应条件下(20℃,5 分钟), α 、 β -不饱和酮基可与试剂定量地形成脞。而 C_{20} -酮很少有反应,可的松在此条件下仅形成 C_3 -单脞化合物,但如在 60℃,90 分钟加热后,则形成 C_3 、 C_{20} -双脞化合物。

为了比色时呈色稳定,常将灰黄色的甾类 2,4-二硝基苯脞衍生物溶于碱液中,使失去质子变为醌式结构,显现深红色。



α 、 β 不饱和羰基所形成 2,4-二硝基苯脞的碱性溶液,其最大吸收在 450 毫微米左右,而 17,21-二羟基-20-酮基所形成的苯脞的碱性溶液,其最大吸收在 495-500 毫微米;

而可的松所形成的双 2, 4-二硝基苯腙衍生物的最大吸收, 介于上述二者之间, 为 475 毫微米。其它腙的碱性溶液多在 425—500 毫微米之间。

仪器和试剂

72 型分光光度计。

甲醇 (C. P.), 2, 4-二硝基苯腙 (C. P.), 盐酸 (A. R.), 氢氧化钾 (C. P.), 激素标准品。

操作步骤

(1) 精确量取相当于黄体酮 3.0 毫克的注射液, 置于试管中, 加 10 毫升甲醇, 小心振荡, 静置数分钟, 吸取上层清液, 如此反复 7—8 次。

(2) 再加甲醇使体积为 100 毫升, 取 10 毫升此溶液, 用甲醇稀释至 25 毫升。

(3) 取此稀释液 1 毫升 (相当含黄体酮约 12 微克/毫升) 加 2, 4-二硝基苯腙液 (1 毫克/毫升甲醇溶液) 0.5 毫升。

(4) 加 1 N 盐酸 1 滴, 盖上用锡纸包裹的木塞。

(5) 在 50℃ 加热 30 分钟后冷却。

(6) 加 1 N 氢氧化钾甲醇溶液 5 毫升, 在 480 毫微米波长中测定。

(7) 为消除试剂的吸收, 需同时作空白校正。

本法呈色稳定, 操作简便, 回收率高。

讨论

关于 2, 4-二硝基苯腙比色法中的介质, 酸的浓度, 试剂浓度, 体积, 反应温度, 加碱量, 呈色后测定等问题, 现以可的松为例讨论如下:

1. 反应介质 以 85—90% 甲醇为最适宜。虽然无水乙醇能获得高的显色强度, 但碱化后生成的氯化钠在无水乙醇中析出, 从而影响测定。

2. 酸的浓度 实验表明随着盐酸浓度的增加, 可使显色强度增强, 直到 1.5N, 再增加酸度不再增加显色强度, 且造成盐份析出。所以溶液的最终酸度以 1.45N 盐酸的浓度为宜。

3. 2, 4-二硝基苯腙溶液的浓度 1 毫克/毫升的酸性甲醇溶液较为适宜 (0.75—1.5 毫克/毫升均可), 浓度较高的试剂往往会使空白显色较深。

4. 反应液体积 最后反应在较小的溶剂中进行, 一般取 0.5 毫升试液和 0.5 毫升试剂, 则便于稀释后读数。

5. 反应温度 0°—59℃ 均可, 选用 20°—59℃ 可以避免使用回流装置; 加热时间从数分钟—2 小时, 随甾类不同而异, 可的松测定以采用 59℃, 90 分钟为宜。

6. 碱量及浓度 以 0.5 毫升 4 N 氢氧化钠溶液呈色较好。

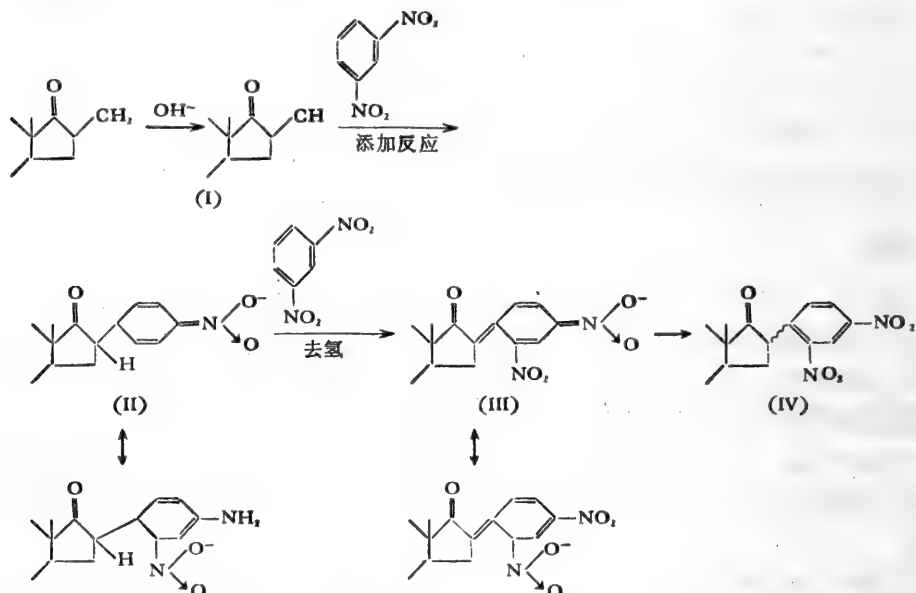
7. 呈色的测量 宜在加碱放置 20—30 分钟, 澄明后, 于 475 毫微米处进行比色测定, 颜色在数小时内稳定。空白溶液显橙色, 放置时很慢褪去。

四、次甲基酮-碱性二硝基苯反应法^[1,10]

凡具有次甲基酮—CH₂—CO—结构的化合物，均能与碱液、间二硝基苯反应，而显出特殊颜色，据此可用比色法进行定量测定。本法在甾类中主要用于 17-甾酮类，也可将 17-羟基甾类皮质激素类转变为 17-甾酮后进行测定。在药典中用于检查苯甲酸雌二醇及炔雌醇中雌（甾）酮杂质，以及可的松、氢化可的松的含量测定。临床上用于尿液中 17-酮甾醇含量测定，以诊断肾上腺皮质癌，睾丸间质细胞肿瘤，脑下垂体机能紊乱等疾病。

原理

具有次甲基酮—CH₂—CO—结构的化合物与碱液间二硝基苯呈色反应 (Zimmermann 反应) 的机制，曾有很多文献进行讨论，归纳起来，整个反应过程，先是添加反应形成发色团结构 (Meisenheimer 型化合物, II)，其后又发生去氢(氧化)反应，产生发色团(III)，可用反应式阐述如下：



在反应中由于碱的催化，使活性次甲基酮形成羧负离子 (I)，而后，负离子向间二硝基苯活性位置作亲核性攻击得到 (II)，过剩的间二硝基苯 (作氧化剂) 使 (II) 脱氢形成 (III)，且可互变形成较稳定的 (IV)。Corker 认为甾酮与间二硝基苯在酸性条件下形成二硝基化合物 (黄色)，在碱中呈紫红色。当用氢氧化季铵代替碱时，可使反应有较高产率和较低的试剂空白。这种改进的方法可测定 0.5 微克的 C₁₇ 甾酮。C₁₇ 甾酮在 α 位有取代时，如 16 羟基、乙酰基、甲磺酰氧基 (CH₃—SO₂—O—) 为负反应，而 16-溴-17 甾酮则为例外，(在反应中可消去 HBr) 呈现出典型的碱性间二硝基苯呈色反应。其反应速度较 17-甾酮为快。

一般说来，酮基邻位次甲基 (—CH₂—) 是阳性反应所必需的，而且这种活性基团，空间上不应受阻碍。因此凡具有一 CH₂—结构的 C₃, 17, 20 位上的甾酮均产生正反应。

Δ^4 -3-酮甾类与间二硝基苯在碱液中生成的产物其最大吸收在 380 毫微米左右。其它 C_{17} 或 C_{20} 酮基甾类亦有此反应,但其吸收峰有所不同。

仪器和试剂

751 型分光光度计、或 72 型分光光度计。康氏震荡器。

(1) 10% 氢氧化四甲基铵。

(2) 氯仿 (G. R.), 用前新蒸馏。

(3) 95% 脱醛乙醇溶液: 每 1000 毫升无水乙醇 (A. R.) 中加 5 克 2,4-二硝基苯肼和 10 毫升浓 HCl 混摇 1—2 分钟放置过夜,如仍有部分 2,4-二硝基苯肼不溶,倒入蒸馏瓶内,加入玻璃珠 10 余个,在水浴锅上回流 4 小时。除去沉淀,在水浴上进行分馏,弃去开始蒸馏出与最后剩余各约 100 毫升左右部分。馏速约 6000 毫升/小时,分馏 2—3 次至完全无色为止。再配成 95% 脱醛乙醇。

(4) 2% 间二硝基苯乙醇溶液: 2 克间二硝基苯先溶于少量无水乙醇中,然后配成 100 毫升溶液,贮于冰箱内备用。用时稍加温,使结晶溶解。当溶液变黄时即不可再用。

(5) 5N KOH 溶液: 称取 28 克 KOH (G. R.) 用少量水溶解后定溶至 100 毫升。

(6) 1N KOH 无水乙醇溶液和甲醇溶液,分别用无水乙醇和甲醇配制。

(7) 标准溶液(0.25 毫克/毫升): 精确称取 0.25 毫克的脱氢异雄甾酮或雄甾酮,溶于 1 毫升无水乙醇中,贮冰箱内备用。

(8) 1N NaOH 溶液: 称取 40 克 NaOH (A. R.), 先用少量水溶解后定溶至 1000 毫升。

操作步骤

1. 药物原料之检测

(1) 苯甲酸雌二醇中雌甾酮的检查:

溶解 0.0025 克苯甲酸雌二醇于 0.5 毫升含有 1N 氢氧化钾的无水乙醇溶液中。加 2% 间二硝基苯无水乙醇溶液 0.2 毫升。25℃ 避光放置 1 小时,加 10 毫升无水乙醇。所生成的反应物有吸收绿色光谱的特性。其吸收强度不应大于按相同操作的以 0.0001 克雌甾酮参考标准品所制备的溶液。

(2) 炔雌醇中雌(甾)酮的检查:

溶解试样 5 毫克于 0.5 毫升甲醇中,加间二硝基苯 0.05 克,加新配制的 1N 氢氧化钾甲醇溶液 0.5 毫升暗处放置 1 小时。加 10 毫升甲醇,其所呈颜色不得深于比较溶液。

比较液的配制,不加试样仅加试剂,其他操作同上。

注: 甾酮与碱液-间二硝基苯呈红紫色(λ_{max} 505 毫微米左右。各种甾酮的最大吸收波长不同)。过量的间二硝基苯存在,使呈色不稳定,当含有水时,颜色褪去较快。间二硝基苯要求分析纯。如纯度不好,空白呈茶褐色,使结果判定困难。

(3) 醋酸可的松与碱液共热的比色测定:

取 1 毫升醋酸可的松甲醇溶液 (50 微克/毫升),置小烧瓶中,在水浴上蒸去溶剂。在残渣中加入 10% 氢氧化四甲基铵 5 毫升。瓶子加塞轻加振摇,然后去塞,置 70℃ 水浴上加热 35 分钟。

空白是取 5 毫升 10% 氢氧化四甲基铵在相同条件下进行,冷却至室温。在分光光度

计上于 373 毫微米处测定其吸收值。显色液放置 12 小时后其吸收值不变。在 10—30 微克/毫升范围内所呈颜色符合 Beer 定律。

表 6.4 某些甾类与碱液共热后的吸收光谱特征

化 合 物	酮 基 位 置	A 环 情 况	λ_{\max} (毫微米)
醋酸可的松	3, 11, 20	Δ^4 -不饱和	373
黄体酮	3, 20	Δ^4 -不饱和	375
睾(甾)酮	3	Δ^4 -不饱和	375
雌(甾)二酮	—	芳香环	a
雌(甾)酮	17	芳香环	a
去氢胆酸	3, 7, 12	饱 和	a

a. 在 350—400 毫微米区域无最大吸收。

2. 尿液中 17-酮甾醇之测定

(1) 尿样品收集：留尿前两天患者应停药一切中西药。在尿收集瓶内预先加入 5% 麝香草酚冰醋酸 5 毫升，收集 24 小时尿。收集瓶应置阴凉处，并记录总尿量，取其约 250 毫升置冰箱中保存。

(2) 水解：量取 24 小时总量的 1/24。（如不足 1000 毫升者用蒸馏水补足至 1000 毫升，总尿量多于 2400 毫升者只取 100 毫升），放入 250 毫升锥形瓶内，加入浓硫酸 10 毫升，瓶口连接冷凝器，于电炉上加热微沸，回流 10 分钟。

(3) 提取：量取 30 毫升氯仿，加至水解后的尿液中，盖紧瓶塞，置康氏震荡器上振荡提取 30 分钟，静置分层后，用分液漏斗分去上层尿液。

(4) 纯化：向氯仿提取液中加入蒸馏水 30 毫升，振荡洗涤 2 分钟，静置分层后分去上面水层。同样重复操作一次。加入 1 N NaOH 溶液 50 毫升，振荡 5 分钟，静置分层后分去上层碱液。再用蒸馏水 30 毫升洗涤 2 次（操作同上），静置 4 小时，分去水层。（或用新华 1 号滤纸过滤除去水分。）

(5) 加样：取 2×12 厘米试管 4 支，分别标明测定空白、测定、标准、试剂空白。前两支分别加入纯化提取液各 2 毫升在水浴上蒸干，（温度应在 80—85℃），用 0.5 毫升氯仿冲洗管壁，再将氯仿蒸干。然后各管按下表加样。

表 6.5

管 号	测定空白管	测 定 管	标 准 管	试剂空白管
水解尿氯仿提取液	2 毫升蒸干	2 毫升蒸干	—	—
95% 脱醛乙醇	0.4 毫升	0.2 毫升	—	0.2 毫升
2% 间二硝基苯	—	0.2 毫升	0.2 毫升	0.2 毫升
5N KOH	0.2 毫升	0.2 毫升	0.2 毫升	0.2 毫升
标准液	—	—	0.2 毫升	—

(6) 显色：将上列各管混匀后，在 25℃ 恒温水浴内避光保温 1 小时，取出后向各管分别加入 80% 乙醇 5 毫升混匀，在 520 毫微米处，以空白管为对照进行比色测定。

(7) 计算：

$$\frac{\text{测定管光密度} - \text{空白管光密度}}{\text{标准光密度}} \times 0.05 \times \frac{24 \text{ 小时尿总量}}{\text{取用尿量} \times 2/30} = \text{毫克/24小时尿}$$

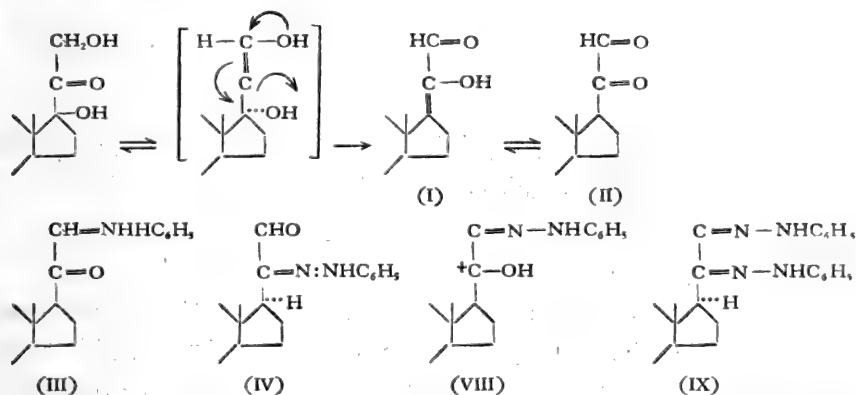
五、17, 21-二羟基皮(甾)醇——盐酸苯肼反应法^[1,2,11-13]

本法是测定可的松及有关 17, 21-二羟基-20 酮基甾类激素的专一方法。常用于生物样品中肾上腺皮质激素的测定。如尿液中 17-羟皮质类固醇的测定。National Formulary 法可用来测定地塞米松磷酸钠冷霜、眼膏、眼溶液制剂。这些制剂经溶剂抽提予处理后再进行测定。

原理

肾上腺皮质激素的 17, 21-二羟基-20 酮基侧链, 在强酸催化下重排, 形成 20, 21-乙二醛基。然后与苯肼形成 21-单苯腙。其结构为发色团化合物 (III), 而不是 (IV)。

重排过程可表达如下:



在强酸条件下, 化合物 III 质子化得到发色团 (VIII), 阻止进一步与盐酸苯肼作用, 因此反应并不形成腙 (IX), 只有在醋酸钠的条件下才能形成 (IX)。溶液呈黄色, 在 240 毫微米处具有吸收峰。

仪器和试剂

1. 仪器 72 型分光光度计。

2. 药品的处理 在测定尿液中 17-羟皮质(甾)醇时, 试剂的处理和配制:

(1) 氯仿的处理: 取 2000 毫升氯仿 (A. R.), 倒入大型分液漏斗中, 加少量硫酸 (G. R.), 振摇静置片刻, 放去 H_2SO_4 层, 重复三次至 H_2SO_4 无色为止。用 1N NaOH 洗涤三次, 直至 pH 接近中性, 然后用水洗一次。(注意 H_2SO_4 最重, 其次氯仿, 再次水, 以免丢失氯仿。)将洗净的氯仿加 K_2CO_3 或 CuCl_2 脱水使呈澄清, 然后再在 80°C 左右水浴中蒸馏弃去头尾备用。注: 回收氯仿不必用 H_2SO_4 洗, 直接用 1N NaOH 洗, 再用水洗至中性, 同上蒸馏即可用。

(2) 正丁醇脱醛: 市售正丁醇用 50% H_2SO_4 调节至 pH = 1 (10 毫升/80 毫升) 每 500 毫升正丁醇加盐酸苯肼 100 毫克, 加热 60°C , 42 分钟, 再用维格氏分馏器分馏, 收集

117—118℃ 正丁醇备用。

(3) 盐酸苯胂重结晶：国产盐酸苯胂 (C. P.) 20 克加无水乙醇直至完全溶解，用水浴微热，不超过 60℃ (约需 1500 毫升乙醇) 溶解后乙醇呈淡黄色，然后加塞，放入冰箱重结晶，用水泵抽干，或用滤纸过滤，装入棕色瓶。放在干燥器内备用。

(4) 甲醇重蒸：取甲醇 (A. R.) 500 毫升加 2, 4-二硝基苯胂 500 毫克，剧烈振摇后，过滤，蒸馏，去其头尾。收集沸点 64.5℃ 的部份。放入棕色瓶保存。

3 试剂配制

(1) 25% H_2SO_4 。

(2) 5N KOH。

(3) 1:10 正丁醇氯仿溶液。

(4) 56% H_2SO_4 : 1 毫升 H_2O 加 1.27 毫升 H_2SO_4 。

(5) 盐酸苯胂试剂：精确称取 65 毫克盐酸苯胂加入 100 毫升 56% H_2SO_4 即成，使其完全溶解。(H_2SO_4 必须用 G. R.，否则空白很高，可按所需量临用前配制。)

(6) 异丙醇 (C. P.)。

(7) 二氯甲烷 (C. P.)。

(8) 麝香草酚 (C. P.)。

(9) 标准溶液分装：

针剂分装，国产氢化可的松 5 毫克/毫升，取 0.5 毫升 (含 2.5 毫克) 加精制甲醇 25 毫升为 100 微克/毫升，然后吸 0.2 毫升 (20 微克) 分装。

操作步骤

1. 甾类药物原料的测定 取 1 毫升甾类甲醇溶液 (1—25 微克)，加 8 毫升盐酸苯胂试剂。[65 毫克盐酸苯胂在 100 毫升 56% 稀硫酸中临时新鲜配制。]在 60℃ ± 1℃ 加热 20 分钟，在流水下冷却 3 分钟。以甲醇-硫酸混合液为对照，在 410 毫微米处进行测定，得吸收值 a 。为了消除其它物质遇硫酸所呈色的干扰，另取一份试品，仅加酸而不加苯胂，处理同上，测得吸收值 b 。

按同上方法测定含有 20 微克的标准品，分别得吸收值为 a' ， b' 。

计算：
$$\text{样品含量(微克)} = \frac{a - b}{a' - b'} \times 20$$

在此条件下，仅具有 17, 21-二羟基-20 酮侧链的甾类如可的松，醋酸可的松，17-羟去氧皮(甾)酮醋酸酯、地塞米松等，与苯胂和硫酸反应，在 410 毫微米处有吸收峰。而甲基睾(甾)酮、雌(甾)二醇、妊娠酮醇等虽可能呈色，但其最大吸收在波长 460—480 毫微米处。

2. 甾类药物制剂的测定 (以冷霜为例，其余亦同)

(1) 标准品制备：精确称取 120 毫克地塞米松磷酸钠参考标准品 (相当于地塞米松磷酸酯 100 毫克)，置于 100 毫升容量瓶中，溶于水，稀释至 100 毫升混匀。取此溶液 10 毫升，置 100 毫升容量瓶中，用水稀释至 100 毫升混匀。

(2) 样品制备：由于冷霜、油膏中的一些基质常会使比色液混浊而影响测定，需要预先进行溶剂提取。

精确称取部分地塞米松磷酸钠冷霜，(约相当于 1 毫克地塞米松磷酸酯)置于含有约 7 毫升氯化钠溶液(1:10)的小分液漏斗中加 25 毫升二氯甲烷，摇动 1 分钟，使冷霜分散，静置至二氯甲烷分层，弃去。再用二氯甲烷提取，再弃去。将水层置于 10 毫升容量瓶中，用 2 毫升水洗涤分液漏斗；将洗液加入容量瓶中，用水稀释到 10 毫升。

(3) 测定步骤：吸取标准品，样品液及水各 2 毫升分置于带塞试管中。在各试管中加入新鲜配制的苯胼试剂 5 毫升。(由 40 毫升水 60 毫升硫酸，50 毫升异丙醇和 65 毫克盐酸苯胼混合组成)。加塞置于 60℃ 水浴 2 小时，冷却后用分光光度计在 410 毫微米处测定各溶液的吸收值。以试剂为空白，标准液吸收值为 AS，样品液吸收值为 AU。

由公式： $100 \text{ 微克} \times 0.9184 \times (AU/AS)$ 计算所取供试部分冷霜中所含的地塞米松磷酸酯的毫克数。0.9184 为地塞米松磷酸钠换算为地塞米松磷酸酯的因素。

3. 尿液中 17, 21-二羟基皮甾醇的测定

- (1) 尿样品的收集：同尿中 17-酮甾醇之测定，见第 178 页。
- (2) 提取：取尿液 3 毫升于 50 毫升容量瓶中，加 $(NH_4)_2SO_4$ 约 2 克，再用 50% H_2SO_4 调至 pH2—3。加 1:10 正丁醇氯仿液 24 毫升，用力振摇 5 分钟。倒入大试管离心沉淀，用毛细管吸去上层废液。
- (3) 硫酸提取显色：取 6 支磨口离心管分别编号按下表加样：

表 6.6

管 号	A	B	C	D	E	F
正丁醇氯仿液(毫升)	8	8	8	8	—	—
抽提液(毫升)	—	—	—	—	8	8
56% H_2SO_4 (毫升)	3	—	3	—	3	—
盐酸苯胼试剂(毫升)	—	3	—	3	—	3
标准液(毫升)	—	—	0.2	0.2	—	—

加塞振摇 5 分钟，然后离心沉淀。将各管之硫酸层吸入另一组对应编号的干净试管中，60℃ 水浴中保温 42 分钟，移入冷水中冷却。在波长 410 毫微米处，以 A 管调零点，读取 OD 值：

(4) 计算：

$$\frac{F(\text{测定管}) - E(\text{空白管}) - B(\text{试剂空白})}{D(\text{标准}) - C(\text{标准空白}) - B(\text{试剂空白})} \times 0.02 \times \text{尿总量} = \text{毫克/24 小时尿量}$$

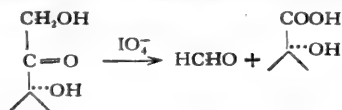
注意：正丁醇、氯仿、盐酸苯胼均需经处理后方能使用。氯仿用后保留，回收后重复使用。D 管 OD 值不宜超过 0.01。正丁醇、氯仿提取液离心沉淀时，小心防破，如有破损需彻底擦净，以免污染下次实验。

六、α-醇酮基——高碘酸氧化反应法^[1,14]

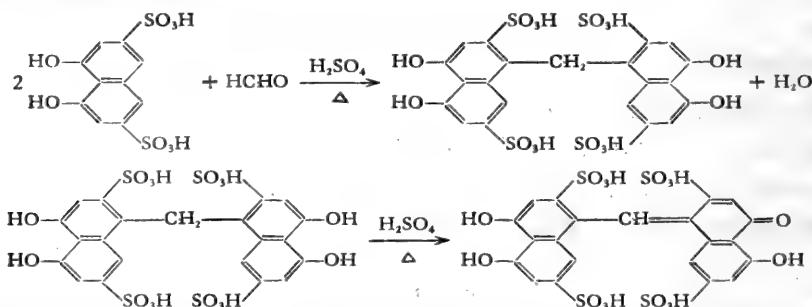
本法可测定药物原料中微量的肾上腺皮质激素

原理

利用高碘酸钾作氧化剂,将 α -醇酮基的 C_{20} - C_{21} 的键打开,21-羟甲基以甲醛形式放出,此甲醛与变色酸反应呈现颜色,借以进行比色测定。多余的氧化剂,可用亚硫酸钠除去。例如 $C_{17,21}$ -二羟基-20-酮基可利用高碘酸盐氧化产生甲醛。



其甲醛在硫酸介质中与变色酸作用,生成紫色化合物,根据溶液颜色深浅,用紫外分光光度计比色测定其含量。



比色液显色稳定,放置 16 小时不变,能测定含甲醛量 100ppm 以上的药物,灵敏度较好。

具有潜在甲醛的甾类均可用本法比色测定。甲醛与变色酸呈色后,其吸收曲线上有三个峰值,即 380、480 及 570 毫微米。但 480 毫微米处仅为其他二个峰值之半,又因乙醛与试剂所呈色的最大吸收在 400 毫微米,所以多选择在 570 毫微米左右处,测定甲醛与试剂呈色的吸收值。

仪器和试剂

- (1) 72 型分光光度计。
- (2) 0.001M 高碘酸钾溶液: 0.001M 在 0.3N 硫酸中。
- (3) 变色酸溶液: 500 毫克变色酸结晶颗粒溶于 4 毫升水中, 4℃ 贮存。临用前用 0.4 毫升稀释至 10 毫升。
- (4) 10% 亚硫酸钠水溶液。
- (5) 冰醋酸 (A. R.)。
- (6) 相应的激素标准品。

操作步骤

取干燥的试品 (2—30 微克) 和标准品 (2—20 微克) 适量, 分别以 0.1 毫升冰醋酸溶解。加 0.4 毫升高碘酸钾溶液, 室温放置 45 分钟。加 0.1 毫升 10% 亚硫酸钠水溶液及 1.0 毫升变色酸溶液置沸水浴中 30 分钟, 冷却在 560 毫微米处测其吸收值 (与试剂空白作对照), 这样由标准品已知量, 可计算出试样的含量。

$$\text{试样含量(微克数)} = \frac{A_{560}}{B_{560}} \times \text{标准品含量(微克数)}$$

A_{560} 为试样在 560nm 处的吸收值

B_{560} 为标准品在 560nm 处的吸收值

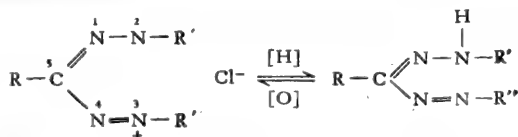
$$\text{试样含量百分数} = \frac{\text{试样含量(微克数)}}{\text{取用试样重量(微克数)}} \times 100\%$$

七、 α -醇酮基——四氮唑盐反应法^[1,3,13,15]

本法用于肾上腺皮质激素药物原料中总甾类含量的测定。

原理

肾上腺皮质激素, C_{17} 位上的侧链 α -醇酮基 ($-\text{CH}(\text{OH})-\text{CO}-$) 结构, 具有还原性质。碱性四氮唑盐可被 α -醇酮基还原为相应带色的甲臌 (Fomazane), 所生成的颜色 (红、紫、蓝) 随所用试剂不同而异。

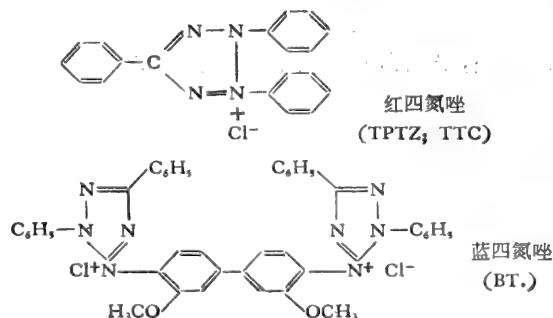


最常采用的四氮唑盐有:

(1) 2, 3, 5 三苯基氯化四氮唑 (简称为 TPTZ; TTC) TPTZ 在甲醇或氯仿中形成近于无色的针状结晶, 遇光变黄, 溶于水、醇、丙酮, 不溶于醚。其还原产物为不溶于水的深红色三苯甲臌, 最高吸收在 490 毫微米处, 故称红四氮唑。

(2) 蓝四氮唑 (简称为 BT), 3, 3'-二甲基苯-双-4, 4'-(3, 5-二苯基)氯化四氮唑, 为柠檬黄色结晶, 易溶于甲醇、乙醇、氯仿, 微溶于水, 不溶于醋酸乙酯、丙酮、乙醚。还原电位约为 -0.08 伏, 还原产物为暗蓝色的双甲臌, 最高吸收波长在 525 毫微米。

结构式:



仪器和试剂

- (1) 72 型分光光度计。
- (2) 无水乙醇 (A. R.)。

(3) 0.5% 三苯氯化四氮唑的乙醇溶液。

(4) 氢氧化四甲基铵的乙醇溶液：取市售 10% 氢氧化四甲基铵水溶液 1 毫升加 9 毫升无水乙醇。

(5) 标准液的制备：精密称取在 105℃ 烘干至恒重的氢化可的松 20 毫克，置于 1000 毫升容量瓶中，加无水乙醇溶解，并稀释到刻度，摇匀。精密量取溶液 10 毫升置于 100 毫升容量瓶中加无水乙醇稀释到刻度摇匀。每毫升中含氢化可的松 0.02 毫克。

(6) 供试溶液制备：精密称取样品适量(约相当于氢化可的松 10 毫克)，加无水乙醇 30 毫升，置水浴上加热使融化，并时时搅拌，用冰水冷却后过滤。滤液置 100 毫升量瓶中。未溶解的样品再用无水乙醇重复提取三次，每次用无水乙醇 20 毫升，加无水乙醇稀释到刻度，摇匀。精密量取溶液 10 毫升，置 50 毫升的量瓶中，加无水乙醇至刻度，摇匀。

操作步骤

精确量取标准液与供试液各 10 毫升，分别置带塞比色管中，另取无水乙醇 10 毫升作空白，先各加 0.5% 三苯氯化四氮唑的无水乙醇溶液 1 毫升，摇匀。再各加氢氧化四甲基铵的乙醇溶液 1 毫升，摇匀，在 25℃ 暗处放置 40—45 分钟，在 485 毫微米处测定其 OD 值。

计算

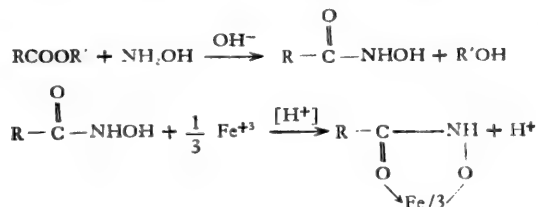
$$\text{每毫升样品含量(毫克数)} = 0.02 \times \frac{\text{样品 OD}_{485}}{\text{标准品 OD}_{485}}$$

八、甾类酯类——碱性羟胺反应法^[1,16]

本法可快速、准确地测定药物原料中甾类酯类的含量。可用于醋酸氢化可的松，醋酸 Δ' 去氢氢化可的松，环戊烷丙酸氢化可的松，环戊烷丙酸 Δ' 去氢氢化可的松，环戊烷丙酸睾酮等测定。

原理

甾类酯类可以与碱性羟胺反应，转变为羟肟酸，再与高铁离子在酸性中络合形成紫色，最大吸收在 530 毫微米处，呈色强度正比于其甾类浓度。



仪器和试剂

(1) 72 型分光光度计。

(2) 无水乙醇 (A. R.)。

(3) 碱性羟胺试剂：等体积 12.5% 盐酸羟胺和 12.5% 氢氧化钠混合，除去不溶的氯

化钠,在使用前 4 小时配制。

(4) 高氯酸铁试液: 800 毫克铁粉加水 3 毫升混匀在烧杯中,逐渐滴加入 10 毫升 70% 高氯酸和 7 毫升水,用无水乙醇稀释至 100 毫升为储备液。取储备液 40 毫升转移到 1 升的容量瓶中,加入 12 毫升高氯酸,然后用无水乙醇稀释到 1 升。溶液铁离子浓度约为 0.0057M, 高氯酸浓度约为 0.16M。

(5) 标准溶液: 甾类酯类标准品配成 1 毫克/毫升的无水乙醇液。

操作步骤

精确称取一定量的试品(约含 46—60 毫克甾类酯类),移置于 50 毫升容量瓶中,以无水乙醇溶解并稀释至 50 毫升,制成约 0.005M 浓度的试样溶液。

取 5 毫升试样溶液置于 50 毫升容量瓶中,加 3 毫升碱性羟胺试剂,放置室温反应(时间按所测定甾类酯类的特性而定,从 10—60 分钟)。反应结束时,溶液用高氯酸铁试液稀释至 40 毫升。避光放置 10 分钟后,溶液再用高氯酸铁试液稀释至 50 毫升。充分混合后在 530 毫微米处测其吸收值。

取标准液 3 毫升及 5 毫升,各置于 50 毫升容量瓶中,3 毫升标准液瓶中加入 2 毫升无水乙醇,按上述方法,同时进行测定。

计算

$$\text{试样中甾类酯类的百分含量} = \frac{A_{530} \times 100}{Q_{530} \times C}$$

式中:

A_{530} 为试品在 530 毫微米处的吸收值。

Q_{530} 为 1 毫克/毫升标准液的吸收值。

C 为每毫升试样液中的毫克数。

讨论

各种甾类酯类与羟胺酸反应速率快慢不一,例如醋酸氢化可的松,醋酸 Δ' 去氢氢化可的松在 5 分钟内即反应完全。而二者的环戊烷丙酸酯则需 20—30 分钟反应完全。环戊烷丙酸甾(甾)酮在室温即使放置 100 分钟也不能反应完全,但在 50℃ 时 50 分钟即可完成。

所形成的颜色,在 530 毫微米处有最大吸收,在避光情况下,至少 1 小时内是稳定的,浓度为 0—0.01M 范围内符合 Beer 定律,吸收值 A_{530} 由 0—1.0。

本法快速准确,精确度高,平均回收率为 99%,标准误差为 $\pm 1.4\%$ 。不具有酯类结构的甾类无干扰,但可形成羟胺酸的化合物。如内酯类,酸酐类、酰氯和亚胺呈阳性反应。其次高浓度的羰基和能与铁离子 (Fe^{+++}) 络合的离子可影响呈色强度,应加避免。

九、雌激素——铁-酚试剂反应法^[1,17]

原理

铁-酚试剂(也称铁-柯柏试剂),与雌激素的芳香环羟基有呈色反应。其呈色与激素

浓度成正比,可用比色法进行定量测定。为了消除空白液棕色本底影响,将标准液与试样溶液都在 520 毫微米及 420 毫微米处测定其吸收值,然后计算含量。

仪器和试剂

- (1) 72 型分光光度计。
- (2) 异辛烷 (A. R.)。
- (3) 70% 乙醇。
- (4) 苯 (A. R.)。
- (5) 30% 碳酸钠溶液。
- (6) 30% (v/v) 硫酸溶液。
- (7) 铁-酚试剂的配制:

溶解 1.054 克硫酸亚铁铵于 20 毫升水中,加硫酸 1 毫升和 30% 过氧化氢 1 毫升,混合,加热至沸腾后停止。加硫酸稀释到 50 毫升,冷却后再加硫酸,使成 100 毫升,备用。

重新蒸馏酚(弃去开始的 10% 与最后的 5%),收集其余馏份于一干燥的已知重量并带有玻塞的烧瓶中,注意防潮,置玻塞瓶于冰浴使酚凝结,以玻棒戳破顶部,压碎,保证全部结晶,干燥、称重。加相当于 1.13 倍酚重量的铁-硫酸溶液,加塞放置,不须冷却,时加摇匀,直至酚液化。剧烈振摇直至混匀,放置暗处 16—24 小时,在混合物中加入其重量为 23.5% 的硫酸和水 (100:110v/v) 配成的溶液,充分混合,转移到一干燥带塞瓶中,贮于暗处,防止吸潮,可保持三个月的稳定。

操作步骤

1. 样品和标准液的配制

(1) 样品液配制 精确量取相当于 0.002—0.010 克苯甲酸雌二醇体积的油溶液,于盛有 20 毫升异辛烷的容量瓶中,加异辛烷至 50 毫升,充分混合。精确吸取相当于 0.001 克苯甲酸雌二醇的上述溶液于 125 毫升分液漏斗中,用异辛烷稀释至约 30 毫升。

(2) 标准液配制 精确称取 0.01 克苯甲酸雌二醇(国际化学参考标准品)溶于少量的苯中,加异辛烷使成 50 毫升,混匀,取此溶液 5 毫升,于盛有 25 毫升异辛烷的 125 毫升分液漏斗中。

2. 将上述各分液漏斗中的内容物分别进行如下处理

(1) 加 70% 乙醇 40 毫升,剧烈振摇 2 分钟,再静置至完全分层,分出乙醇溶液到另一盛有约 20 毫升异辛烷的分液漏斗中,振摇 1 分钟,分层后,放出乙醇层于 400 毫升烧杯中,同样重复用乙醇提取 5 次,每次 15 毫升,合并提取液于 400 毫升烧杯中,弃去异辛烷溶液。在乙醇合并液中加入 30% 碳酸钠溶液 5 毫升,加碳化硅几小片或几粒小玻璃珠,在水浴上缓缓煮沸,蒸去乙醇至 10—20 毫升,冷却后转移到分液漏斗中。以 20 毫升 10% 氢氧化钠试液洗涤烧杯,以水数次冲洗烧杯,每次 2 毫升,使完全转移到上述分液漏斗中,再以异辛烷 30 毫升冲洗烧杯,倒入分液漏斗,振摇 2 分钟。分取碱液层于另一分液漏斗 A 中。

(2) 以 10% 氢氧化钠试液每次 10 毫升提取异辛烷两次,合并至分液漏斗 A 中,用冷却的 30% (v/v) 硫酸液酸化混合的碱液,至呈明显酸性,充分冷却,加 20 毫升苯振摇

2 分钟。(如 5 毫升苯的蒸发残渣与铁-酚试剂形成混浊时,应将苯重新蒸馏后使用)。转移水层至分液漏斗 B 中,将苯层留在 A 中,再在 B 中加苯提取两次,每次 20 毫升,弃去水层。

(3) 在分液漏斗 A 中和分液漏斗 B 中,分别连续以 30% 碳酸钠洗涤苯两次,每次 5 毫升,随后用水洗涤两次,每次 5 毫升。最后一次的水洗涤液尽可能自苯层分出。倾出分液漏斗 A 的苯提取液于一干燥的 100 毫升烧杯中,加入约 1 克无水硫酸钠,并旋摇至苯层完全变清,倾泻苯液于 50 毫升干燥容量瓶中,切勿倾入硫酸钠。以分液漏斗 B 的苯提取液,冲洗分液漏斗 A,并使苯在硫酸钠上澄清,加入到容量瓶中。用苯洗分液漏斗和烧杯两次,每次 4 毫升,以硫酸钠使洗液澄清,澄清后也加到容量瓶中,加适量苯,使成 50 毫升(苯提取液放置 5 分钟后,若有轻微混浊,而界面很清晰不影响实验。)

(4) 精确分取相当于含约 0.00004 克苯甲酸雌二醇的苯溶液两份,置于 18 毫米 × 150 毫米干燥试管,加几片碳化硅或几粒小玻璃珠,在水浴上蒸发溶剂(不用空气流吹干),直至沸腾刚好在碳化硅片上停止。立即移去试管,很快擦干置于真空干燥器中,减压干燥 1 小时。

(5) 在各管及空白管加一玻璃珠,向每管中用滴定管加 1 毫升铁-酚试剂,每次加试剂前很快用吸水纸擦滴定管的外端,滴定管的活塞用铁-酚试剂润滑。(防止润滑油的干扰)。1 毫升试液在 30 秒或更少时间内放出,立即用橡皮指套紧塞,剧烈振摇试管 5 分钟。试管置于沸水浴中 30 分钟,在开始 5 分钟振动各管数秒钟。置试管于冰浴 2 分钟,然后移出,由滴定管准确加入 4 毫升硫酸溶液。(小心地加 35 倍体积硫酸于 65 倍体积水中制成。)放置 5 分钟,先缓缓然后激烈振摇使其充分混合,以空白作为对照,在 525 毫微米和 420 毫微米测定样品和标准液的吸收值。(420 毫微米的吸收值为铁-酚试剂的棕色本底。)

计算:

$$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{O} \cdot \text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2 \text{ 的毫克数} = 0.04 \times \frac{A_{525} \text{ 毫微米样品} - A_{420} \text{ 毫微米样品}/2}{A_{525} \text{ 毫微米标准} - A_{420} \text{ 毫微米标准}/2}$$

注: 本法所用分液漏斗的活塞,除以水润滑外,不用其他润滑剂。

十、尿中雌(甾)酮、雌(甾)二醇、雌(甾)三醇——Brown 测定法^[18,20]

本法用于测定尿中雌(甾)酮,雌(甾)二醇,雌(甾)三醇的含量,借以诊断卵巢机能。

仪器和试剂

- (1) 72 型分光光度计。
- (2) 重蒸乙醚(A. R.)。
- (3) 石油醚(A. R.), 沸点 40°—60℃。
- (4) 苯(A. R.) 重蒸后用水饱和。
- (5) 无水乙醇: 需经脱醛处理¹⁾。

1) 无水乙醇脱醛处理: 将无水乙醇 2000 毫升放入容量为 3000 毫升的试剂瓶中,加 2, 4-二硝基苯肼 10 克摇匀后,加浓盐酸 20 毫升,放置 24 小时以上,水浴煮沸,回流 4 小时,分馏二次,取沸点 78—78.5℃。

(6) 硼酸粉 (C. P.)。

(7) 硫酸二甲酯 (A. R.) 沸点 188℃, 重蒸。

(硫酸二甲酯的蒸气有毒, 不能直接用口吸, 用吸球吸取, 并在通风橱内进行)。

(8) pH10.5 浓碳酸盐溶液: 将 20% (w/v) NaOH (C.P.) 50 毫升加到 100 毫升的 8% (w/v) NaHCO₃ (C. P.) 溶液中, 混合即成。

(9) 层析用氧化铝 (A. R.) 中性、粒度范围 100—150 目。加水调整活性至特定标准。

(10) 30% H₂O₂。

(11) H₂SO₄ (G. R.)。

(12) 显色剂: 雌(甾)三醇显色剂为 10 克氢醌溶于 500 毫升 76% (v/v) 硫酸中。雌(甾)酮显色剂为 10 克氢醌溶于 500 毫升 66% (v/v) 硫酸中。雌(甾)三醇显色剂是将优级纯的浓硫酸 380 毫升加到经过重蒸处理的蒸馏水 120 毫升中, 冷却, 再加水至 500 毫升刻度, 最后加入氢醌 10 克, 加温助溶。冷却后倒入棕色瓶内贮存, 放置 24 小时后才能应用。

(13) 标准液: 雌激素贮存液 (10 毫克/100 毫升): 精确称量纯结晶雌激素或它们的甲基醚 10 毫克, 溶于无水乙醇中, 制成 100 毫升溶液。用时将贮存液用无水乙醇稀释为 10 微克/100 毫升。(在 4℃ 下贮存液可长期保存)。

操作步骤

流程见表 5.7

1. 样品收集 24 小时尿, 不加防腐剂, 记录尿量, 如其尿量少于 1200 毫升, 则需加蒸馏水补足。

2. 水解和初步提取

(1) 取尿 200 毫升, 置 500 毫升圆底烧瓶中, 回流煮沸, 加浓盐酸 30 毫升, 继续煮沸 60 分钟冷却。

(2) 倒入 500 毫升分液漏斗中, 先后用乙醚 200 毫升, 100 毫升, 100 毫升提取三次。

(3) 合并乙醚提取液, 加 pH10.5 浓碳酸盐溶液 80 毫升洗涤, 振摇后弃去碱液。

(4) 加 8% NaOH 20 毫升, 用力振摇 100 次, 随即加 8% NaHCO₃ 80 毫升, 用力振摇 100 次。将 NaOH-NaHCO₃ 液层弃去。

(5) 用 8% NaHCO₃ 20 毫升洗涤一次。

(6) 用水 10 毫升洗一次。尽可能将水去尽。

(7) 将乙醚提取液倒入干燥的 500 毫升圆底烧瓶中, 水浴蒸干。

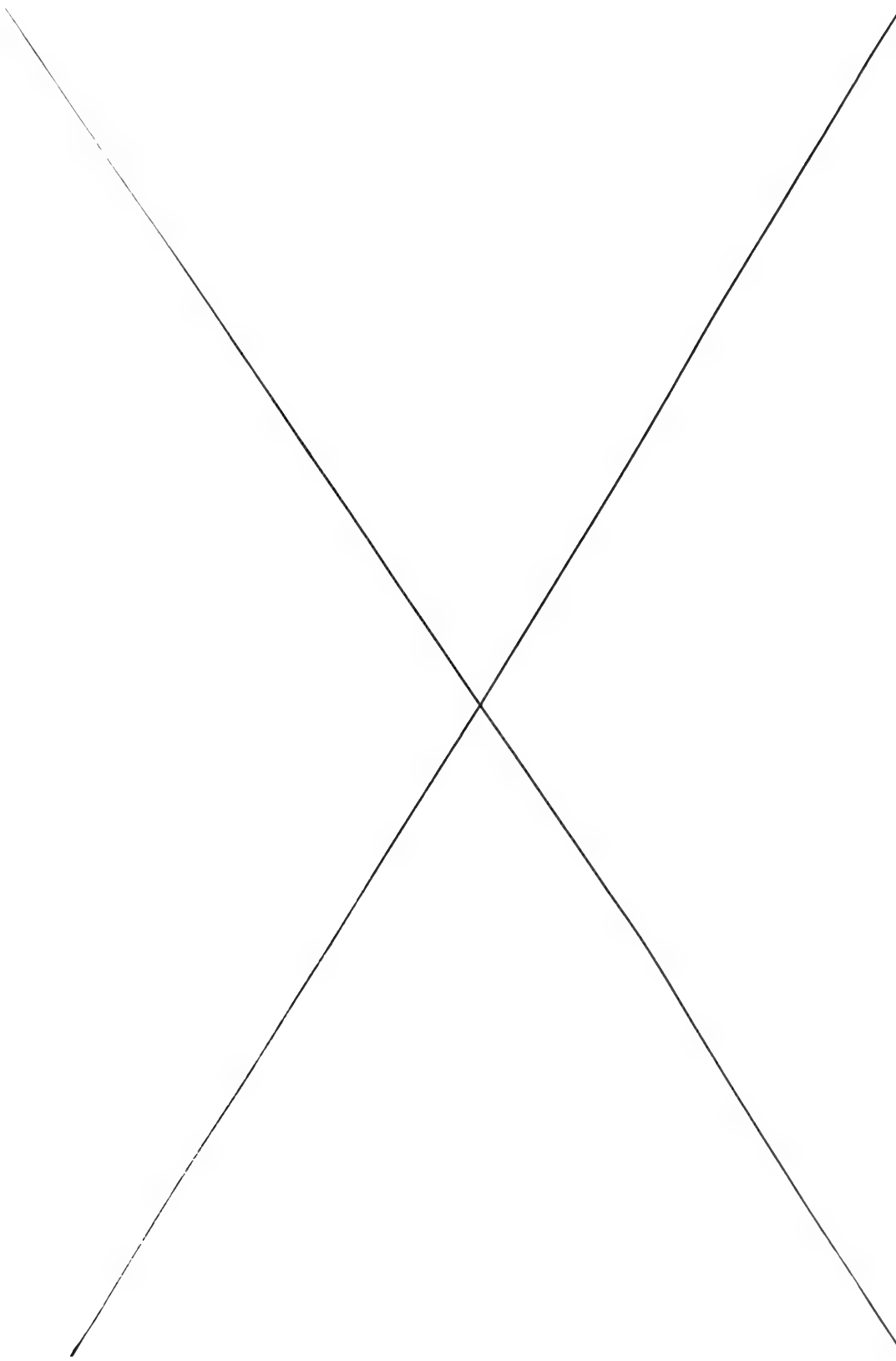
(8) 趁热加无水乙醇 1 毫升, 以溶解残渣, 即得乙醇初提物溶液。

3. 第二次提取和皂化

(1) 用苯 25 毫升将上述乙醇初提物溶液转移到已加有石油醚 25 毫升的分液漏斗中。

(2) 用 2×25 毫升水提取出苯-石油醚溶液中的雌三醇部分。将提取液置于一个 100 毫升圆底烧瓶中, 加 40% NaOH 5 毫升。

(3) 用 1.0% NaOH 2×25 毫升提取苯-石油醚溶液中的雌酮-雌二醇部分。将提



8%(

准。

(甬)
级纯
刻度
用。

甲基
10 微

蒸馏

沸 60

摇 10

中。

毫升

取液置于另一个 100 毫升圆底烧瓶中,加 40% NaOH 3 毫升。

(4) 将以上两烧瓶分别回流煮沸 30 分钟,冷却,各加入 6 克 NaHCO_3 溶解。

(5) 分别转入 150 毫升或 250 毫升的分液漏斗中,并分别处理:

a. 含雌三醇的碱液用乙醚 50 毫升提取一次,将下层碱液弃去,再用 1.6% NaOH 2×25 毫升提取出乙醚层中的雌三醇。将水层提取液放入加有硼酸 0.9 克的带塞 100 毫升三角烧瓶中。

b. 含雌酮-雌二醇的碱液,用苯 25 毫升提取一次,弃去碱液层后,用 5 毫升水洗涤,弃去水液层,加入石油醚 25 毫升,然后再用 1.6% 氢氧化钠 2×25 毫升提取,将水层提取液放入含有硼酸 0.9 克的带塞 100 毫升三角烧瓶中。

4. 甲基化和甲基化雌激素的提取

(1) 向以上两瓶各加硫酸二甲酯 1 毫升,加塞,置 37°C 恒温水浴中,用力振摇直至硼酸与硫酸二甲酯完全溶解,再于水浴中放置 15—30 分钟。

(2) 再次各加硫酸二甲酯 1 毫升和 20% 氢氧化钠 2 毫升,振摇至全溶,继续在水浴中放置半小时,或在室温过夜。

(3) 在已冷却的两瓶中,各加 20% NaOH 10 毫升和 30% H_2O_2 2.5 毫升,以氧化杂质。

(4) 将以上两混合液分别倒入分液漏斗中,用苯 25 毫升提取雌三醇甲醚,以石油醚 25 毫升提取雌酮及雌二醇甲醚。

(5) 分别以水 2×5 毫升,洗涤提取液,最后尽量除去水份。

5. 柱层析 层析柱的内径为 10—12 毫米,下端用少量脱脂棉或玻璃棉填塞。

(1) 雌三醇部分:

a. 将水饱和苯倒入层析柱,加入 Al_2O_3 2 克搅匀装柱。

b. 苯提取液过柱。

c. 用含有 1.4% 乙醇的苯 12 毫升洗脱杂质。

d. 用含有 2.5% 乙醇的苯 15 毫升洗脱雌三醇甲醚,收集于大试管中。

(2) 雌酮-雌二醇部分:

a. 将水饱和石油醚倒入层析柱中,与 Al_2O_3 搅匀装柱。

b. 将含雌酮-雌二醇的石油醚提取物过柱。

c. 25% 苯-石油醚 12 毫升洗脱杂质。

d. 用 40% 苯-石油醚 16 毫升洗脱雌酮甲醚,收集于大试管中。

e. 用 40% 苯 12 毫升洗脱雌二醇甲醚。收集于大试管中。

6. 显色¹⁾

(1) 于各收集管及空白管中,各加 2% 氢醌-乙醇溶液 0.2 毫升,水浴减压抽干,移出水浴充 N_2 。

(2) 分别加入相应的显色剂 3 毫升。

(3) 将各管置于沸水浴中 20 分钟。移动试管,溶解管壁残渣。在加热前 6 分钟内振摇二次。

1) 显色: 不同厂号的硫酸和氢醌对显色剂的影响很大,有时标准物的显色液会产生低的 OD 值,通过调整硫酸浓度和显色时间,可以提高 OD 值。显色时所用蒸馏水应预重蒸处理。

(4) 冷却(置冷水中 5—10 分钟)加水。雌三醇管内加 1.0 毫升,雌酮管加 0.5 毫升,雌二醇管加 0.2 毫升。

(5) 置沸水浴中 10 分钟、冷却。

7. 比色

用分光光度计在下列三个波长测得 OD 值。(比色时以相应处理的试剂空白作为零。)

雌三醇	480 毫微米	516 毫微米	552 毫微米
雌酮	480 毫微米	516 毫微米	552 毫微米
雌二醇	480 毫微米	518 毫微米	556 毫微米

8. 计算

雌三醇-雌酮 OD 校正值 = $2 \times OD_{516} - (OD_{480} + OD_{552})$

雌二醇 OD 校正值 = $2 \times OD_{518} - (OD_{480} + OD_{556})$

根据校正值,查标准线,得出 200 毫升尿中各种雌激素的含量。然后根据 24 小时总尿量计算 24 小时尿中的雌激素量。如果标准物系雌激素甲醚,结果应为 0.95。(游离雌激素与雌激素甲醚的分子量比值为 0.95)。

9. 雌激素标准曲线的绘制

(1) 配制雌二醇,雌酮和雌三醇标准液,浓度分别为每毫升无水乙醇中含标准物 10 微克,5 微克,2.5 微克。

(2) 取上述各标准液 1 毫升,分别置 100 毫升磨口锥形瓶中。

(3) 向各含标准物的锥形瓶中加入硼酸 0.9 克,1.6% NaOH 50 毫升,混匀。

(4) 以下进行甲基化、层析显色及比色计算。同测定样品操作过程。(详见方法 4—8 部分。)

(5) 每种标准物,每种浓度分做三份测定,取平均值,以标准物量(微克)为横座标,以 OD 值为纵座标,绘制标准线。

讨论

测定尿中雌酮、雌三醇、雌二醇的含量,可了解孕龄妇女的排卵状况。一般排卵前后尿中雌三醇含量高峰达 30—40 微克/24 小时尿,雌酮高峰达 20—30 微克/24 小时尿。雌二醇高峰达 10—20 微克/24 小时尿。怀孕后雌激素含量可越来越高,雌二醇最高达 10,000 微克/24 小时尿以上。

若尿中雌激素测定无高峰出现,说明卵巢机能不正常。

一般采用隔日测定一次。

十一、尿中孕(甾)二醇——Kiopper 测定法^[21]

仪器和试剂

(1) 72 型分光光度计。

(2) 甲苯: (A. R.) 重蒸处理。

(3) 苯: (A. R.) 重蒸处理。

(4) 石油醚: 沸程 40—60℃, 重蒸处理。

(5) 氯化乙酰: 于氯化乙酰 2000 毫升中, 加二甲基苯胺 140 毫升(慢加, 边加边摇) 放置 24 小时以上分馏二次, 收集沸点 50—54℃ 部分。

(6) 无水乙醇: (A. R.) 经脱醛处理分馏二次。

(7) 氧化铝: 层析用, 中性, 粒度范围 100—150 目。调整含水量为适当的活性度: 第一次层析用 Brockmann 二级, 第二次层析用 Brockmann 四级。

(8) 含 25% NaCl 的 1N NaOH 溶液: 将氯化钠 250 克置于 1000 毫升容量瓶中, 以 1N NaOH 溶解, 并加至 1000 毫升刻度混匀。

(9) 含 4% KMnO_4 的 1N NaOH 溶液: 可按需要量临时配用。

(10) 乙醇/苯洗脱液: 按 v/v 为基础配制。

操作步骤

1. 样品收集 收集 24 小时尿, 不加防腐剂, 在 4℃ 存放。

2. 水解提取

(1) 取 24 小时尿量的 1/40, 用蒸馏水稀释至 75 毫升, 置于 250 毫升的圆底烧瓶中, 加甲苯 25 毫升, 回流加热至近沸腾, 加浓 HCl 7.5 毫升, 继续煮沸 10 分钟, 取下, 冷水冷却至室温。

(2) 将水解后的尿液倒入 250 毫升分液漏斗中, 振荡 3 分钟, 分离甲苯层, 然后在分离出的尿液层中加入甲苯 25 毫升再次提取。

(3) 合并甲苯提取液, 加含有 25% NaCl 的 1N NaOH 溶液 12.5 毫升振荡 1 分钟, 静置 3 分钟, 弃去水液层。

3. 高锰酸钾氧化

(1) 取含有 4% KMnO_4 的 1N NaOH 溶液 25 毫升加至苯层中, 振荡 10 分钟, 将高锰酸钾 (KMnO_4) 层弃去。

(2) 苯层用蒸馏水 5×25 毫升洗涤至无色。最后尽可能除去水份。

(3) 将苯液通过滤纸(新华 1 号)滤入干洁的小玻瓶中。

4. 第一次层析

(1) 取长 12 厘米, 内径为 1.0 厘米的层析柱, 以脱脂棉或玻璃棉填塞下端。

(2) 以水饱和苯和 Al_2O_3 3 克搅匀装柱。

(3) 苯提取液过柱。

(4) 用含有 0.8% 乙醇的苯 25 毫升洗脱杂质。

(5) 用含有 3% 乙醇的苯 12 毫升洗脱孕二醇, 收集于大试管中。

注意: 层析时洗脱液的用量, 应根据活性情况予以增减。

(6) 将收集液在水浴上减压抽干。

5. 乙酰化

(1) 取苯 2 毫升溶解残渣。

(2) 加氯化乙酰 2 毫升加盖, 在室温放置 1 小时以上。

(3) 用石油醚 25 毫升, 将内容物转移到 150 毫升分液漏斗中。

(4) 用 50 毫升水洗, 弃去水液。

(5) 用 8% NaHCO_3 25 毫升洗, 弃去水液。

(6) 用 2×25 毫升水洗, 最后尽可能将水放尽。

6. 第二次层析

(1) 用水饱和石油醚与 3 克 Al_2O_3 搅匀装柱。

(2) 石油醚提取液过柱。

(3) 苯 15 毫升洗柱, 将洗脱液(含孕二醇)收集于大试管中。

(4) 水浴减压蒸干。

7 显色 加浓硫酸 5 毫升溶解残渣, 置沸水浴中 5 分钟, 冷却。

8. 比色 在波长 430 毫微米处测 OD 值, 以 H_2SO_4 空白管作为对照。

9. 制作标准曲线 取十支试管编号, 分别加不同浓度的标准液 1 毫升(每毫升无水乙醇溶液中, 分别含孕二醇标准物 0.025 毫克、0.05 毫克、0.1 毫克、0.2 毫克、0.3 毫克)每种浓度均作双份。水浴减压蒸干。经乙酰化, 层析, 显色, 比色各步骤, 测出相应的 OD 值。以孕二醇毫克数为横座标, 以 OD 值为纵座标绘制标准曲线。

10. 计算 根据测得的 OD 值, 对照标准线查出孕二醇的毫克数, 再乘以 40, 即为 24 小时尿中孕二醇的毫克数。

参 考 资 料

- [1] 南京药学院, 药物分析(教学参考书), 下册, 1976.
- [2] 木嶋敬二, 日本分析化学, 23(12), 1610. (1974).
- [3] United State Pharmacopoeia (18).
- [4] 沈克温, 国外医学参考资料药学分册, 1975 年 4 期 210 页.
- [5] Choulis, N. H. *Can. J. Pharm. Sci.*, 3(3), 76(Eng), (1968). *CA*, 70, 40653 (1967).
- [6] Umberger, E. J., *Anal. Chem.*, 27, 768, (1955).
- [7] Kaito, T. et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 20(3), 589, (1972).
- [8] 天津药检所, 药检工作通讯, 3, 16, 21. (1959).
- [9] Gornall, A. G. et al., *J. Biol. Chem.*, 201, 279, (1951).
- [10] Corker, C. S. et al., *Biochem. J.*, 83, 583, (1962).
- [11] Porter, C. C. et al., *J. Biol. Chem.*, 185, 201, (1950).
- [12] Barton, D. H. et al., *J. Chem. Soc.*, 2027, (1961).
- [13] National Formulary, X III, 209, 878 (1970).
- [14] Bongiovanni, A. M. et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 48(2), 320, (1965).
- [15] 天津药品标准 1974.
- [16] Foristand, A. A. et al., *J. Amer. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 47, 520, (1958).
- [17] International Pharmacopoeia, II, 202, 623, (1967).
- [18] Brown, J. B., *Biochem. J.*, 60, 185, (1955).
- [19] Brown, J. B. et al., *J. Endocrinol.*, 16, 49, (1957).
- [20] Bron, J. B., *Advances in Clin. Chem.*, vol. 3, pp. 180, (1960).
- [21] 天津市总医院检验科, 生化实验手册, 207 页(1974).

第七章 辅酶类

顾涵英 蔡武城

某些酶要表现出活性,需要一种专一的辅酶参与酶反应。许多酶,特别是不需氧的脱氢酶、转移酶类,往往都需要辅酶。在酶的催化反应中,辅酶常接受由作用物分子上脱下来的原子、电子或某种基团,或供给作用物分子以上述物质。

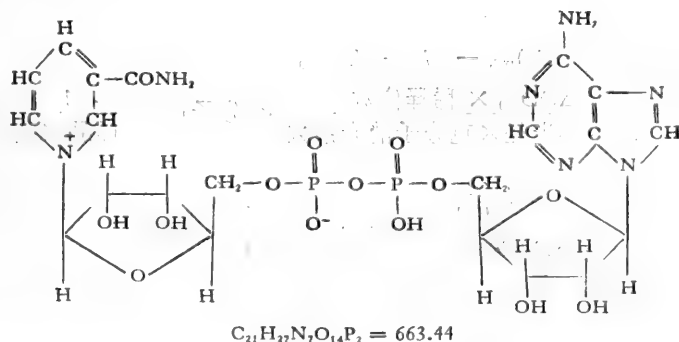
酶蛋白和辅酶分别单独存在,都没有催化作用,互相结合成全酶才具有活性。两者的结合有一定的质和量的关系。辅酶不足,即使有大量酶蛋白存在,组成全酶的总量少,酶活性也不完全表现。辅酶与酶蛋白不仅在量上有一定的比例,而且在种类的配合上一般也是特定的。辅酶的测定就是利用这一特点。选择特定的酶系统,在足够的酶蛋白存在下,辅酶浓度从低到高,测定酶的活力与辅酶浓度成直线关系,根据酶所表现的活力计算辅酶含量。

本章介绍了辅酶 I、还原型辅酶 I、辅酶 II、还原型辅酶 II、黄素腺嘌呤二核苷酸、硫胺素焦磷酸、磷酸吡哆醇、磷酸吡哆胺和辅酶 A 的测定。种类和方法的选择立足于国内已经使用者,适用于辅酶类试剂的测定。

一、辅酶 I——醇脱氢酶法^[1]

原理

菸酰胺腺嘌呤二核苷酸 Nicotinamide adenine dinucleotide 又称辅酶 I(NAD⁺, NAD, CoI 或 DPN)。分子式如下:



辅酶 I 可被乙醇与醇脱氢酶定量地还原为 NADH 而进行测定。



此反应的平衡常数有利于 NADH 氧化为 NAD⁺, 因此,需调节 pH 值至 9—10, 并采用较高浓度的乙醇(但要注意过浓会引起酶活力下降),才能使 NAD⁺ 起还原反应。

氧化型的辅酶在 260 毫微米有一个强吸收峰,而还原型的则除了在 260 毫微米有吸

收峰外,在 340 毫微米处出现一个新的吸收高峰。因此,可以通过在 340 毫微米波长下光吸收的增加来测定辅酶 I 的含量。

试剂

1. 醇脱氢酶 (ADH) 的制备 新鲜面包酵母在阴处吹干。200 克干的面包酵母粉加 600 毫升 0.066M 磷酸氢二钠, 37℃ 缓慢搅拌 2 小时, 室温继续搅拌 3 小时, 离心 3000 转/分, 15 分钟, 上清液迅速热至 55℃, 维持 15 分钟, 立即冷至 0℃, 离心 4000 转/分, 5 分钟。上清液每 100 毫升缓慢加入 55 毫升 -15℃ 丙酮, 使酶始终保持 -2℃ 左右 (盐水浴), 0℃ 离心, 4000 转/分, 10 分钟。上清液再按第一次体积每 100 毫升加冷丙酮 55 毫升, 0℃ 离心 4000 转/分, 10 分钟。沉淀物悬浮在 50 毫升水中, 对冷蒸馏水透析 3—4 小时, 离心除去白色沉淀。上清液每 100 毫升加固体硫酸铵 36 克, 0℃ 放置半小时。离心 4000 转/分, 30 分钟, 沉淀物溶解于 10 毫升蒸馏水, 小瓶分装, 低温保存备用。

2. 0.5M 乙醇—0.1M Tris 溶液 (pH10) 4.6 克无水乙醇加 2.4 克三羟甲基氨基甲烷, 最后加蒸馏水稀释至 200 毫升。

3. 样品 NAD⁺ 溶液 10 毫克样品用蒸馏水溶解成 1 毫克/毫升。

操作步骤

按下列步骤加入:

	空白	样品
乙醇-Tris 溶液	0.4 毫升	0.4 毫升
NAD ⁺ 样品溶液	—	0.2 毫升
蒸馏水	2.5 毫升	2.3 毫升
醇脱氢酶溶液	0.1 毫升	0.1 毫升

在 1 厘米光径的比色杯中, 紫外分光光度计先读取加醇脱氢酶前的 340 毫微米光密度值, 为 E_0 ; 加酶搅匀后读取 340 毫微米的光密度值, 直到读数不再升高为止, 为 E_{10} 。

计算

$$\begin{aligned}\Delta OD_{340} &= (E_1 - E_0)_{\text{样品}} - (E_1 - E_0)_{\text{空白}} \\ NAD^+ \% &= \frac{\Delta OD_{340} \times \text{稀释倍数}}{\text{比色杯光径} \times \text{克分子消光系数}} \times \text{分子量} \times \frac{1}{\text{样品浓度}} \times 100 \% \\ &= \frac{\Delta OD_{340} \times \frac{3}{0.2}}{1 \times 6.22 \times 10^3} \times 663.44 \times \frac{1}{1} \times 100 \% \\ &= \frac{\Delta OD_{340} \times 15 \times 663.44}{6.22 \times 10^3} \times 100 \%\end{aligned}$$

讨论

(1) 焦磷酸盐能与抑制醇脱氢酶的重金属离子结合, 因此 0.5M 乙醇—0.1M Tris 溶液也可用 0.5M 乙醇—0.1M 焦磷酸盐所代替。

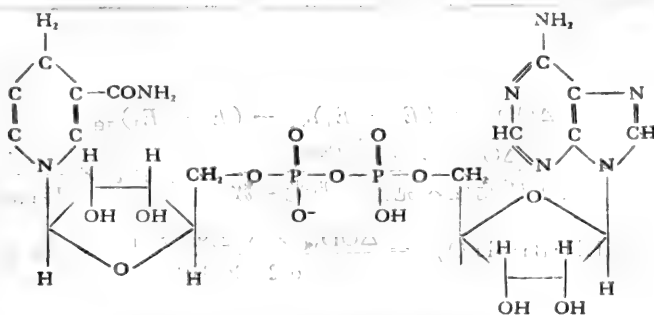
(2) 由于反应平衡不利于 NAD⁺ 的还原, 因此 pH 值及乙醇的浓度是正确测定的重

要因素。

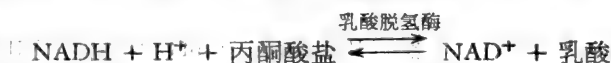
二、还原型辅酶 I——乳酸脱氢酶法^[1]

原理

还原型菸酰胺腺嘌呤二核苷酸(还原型 NAD, 或 $\text{NADH} + \text{H}^+$), 分子式如下:



还原型辅酶 I 可被丙酮酸盐与乳酸脱氢酶定量地氧化为辅酶 I 而加以测定之。



此反应的平衡常数有利于形成 NAD^+ , 只要有稍微过量的底物, NADH 就可以定量地氧化。通过在 340nm 波长下光吸收的减少来测定 NADH 的含量。

试剂

1. 乳酸脱氢酶 (LDH) 的制备 取兔腿或背肌 500 克, 捣碎后, 用 1 倍体积水抽提 10 分钟, 过滤, 清液加固体硫酸铵到 0.52 饱和度, 边加边搅拌, 放置, 过滤或离心, 清液加硫酸铵到 0.7 饱和度, 离心 4000 转/分, 20—30 分钟, 沉淀溶于 15 毫升水, 对 0.03M 乙二胺四乙酸溶液透析 (pH7.4, 每升含 0.372 克乙二胺四乙酸二钠盐), 清液冷冻干燥。

乳酸脱氢酶溶液: 上述制得乳酸脱氢酶干粉 10 毫克溶解于 1 毫升蒸馏水中。

2. 0.05M pH7.5 Tris 溶液 6.06 克三羟甲基氨基甲烷溶解于 25 毫升蒸馏水, 加 40 毫升 0.1N 盐酸, 最后稀释到 100 毫升。

3. 丙酮酸钠溶液 110 毫克丙酮酸钠溶解于 20 毫升蒸馏水中。

4. 还原型 NAD 样品溶液

$\text{NADH} \cdot \text{Na}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ——称取 10 毫克溶解于 10 毫升蒸馏水中。

$\text{NADH} \cdot \text{Ba} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ——称取 10 毫克溶解于 10 毫升蒸馏水中, 加少量无水硫酸钠, 离心除去硫酸钡沉淀即可。

操作步骤

按下列步骤加入:

在 1 厘米光径的比色杯中, 紫外分光光度计先读取加酶前的 340 毫微米的光密度, 为 E_0 ; 加酶搅匀后读取 340 毫微米的光密度, 直至读数基本不变为止, 为 E_1 。

试 剂	组 别	空 白	样 品
Tris 缓冲液 (0.05M, pH7.5)		2.0 毫升	2.0 毫升
丙酮酸钠溶液		0.1 毫升	0.1 毫升
还原型 NAD 样品液		—	0.2 毫升
蒸馏水		0.8 毫升	0.6 毫升
乳酸脱氢酶溶液		0.1 毫升	0.1 毫升

计算

$$\Delta OD_{340} = (E_0 - E_1)_{\text{样品}} - (E_0 - E_1)_{\text{空白}}$$

$$\text{还原型 NAD\%} = \frac{\Delta OD_{340} \times \text{稀释倍数}}{\text{比色杯光径} \times \text{克分子消光系数}} \times \text{分子量} \times \frac{1}{\text{样品浓度}} \times 100\%$$

$$\text{NADH} \cdot \text{Ba} \cdot 4\text{H}_2\text{O}\% = \frac{\Delta OD_{340} \times 872.99 \times 15}{6.22 \times 10^3} \times 100\%$$

$$\text{NADH} \cdot \text{Na}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}\% = \frac{\Delta OD_{340} \times 781.48 \times 15}{6.22 \times 10^3} \times 100\%$$

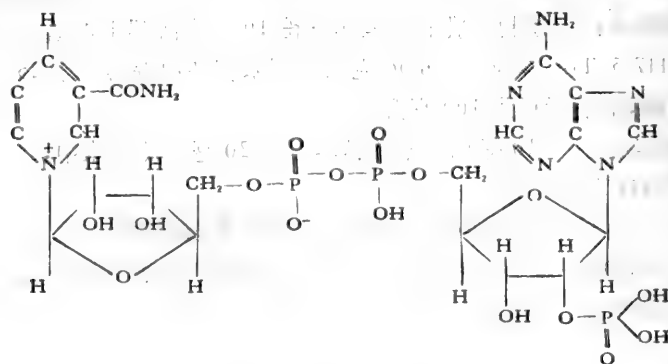
讨论

肌肉乳酸脱氢酶亦能与还原型辅酶 II 起反应。在 pH7.8 条件下还原型辅酶 I 的氧化速度大约比还原型辅酶 II 快 2000 倍, 所以通过 pH 条件的控制可消除还原型辅酶 II 的干扰。

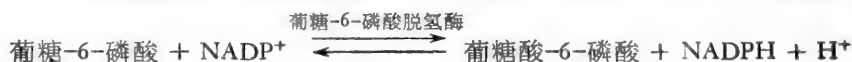
三、辅酶 II——葡萄糖-6-磷酸脱氢酶法^[2,3]

原理

菸酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸又称辅酶 II (NADP⁺, NADP, TPN 或 CoII)。其分子式为:



NADP 可通过葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G-6-PD) 催化还原为 NADPH 而加以测定。



此反应的平衡常数有利于 NADP^+ 的定量还原,因而可根据产生的 NADPH , 即在 340 毫微米波长下,光吸收的增加来测定辅酶 II 的含量。

试剂

1. 葡糖-6-磷酸脱氢酶的制备 新鲜啤酒酵母滤干,摊在阴凉处吹干。400 克干的啤酒酵母粉,加 1.2 升 0.1M 碳酸氢钠,40℃ 搅拌 5 小时,离心 5500 转/分,30 分钟,得清液约 700 毫升。

酶液加 3 倍体积 0.1M 碳酸氢钠,加入固体硫酸铵至 0.55 饱和度,冷处放置几小时后离心,5500 转/分,30 分钟,收集清液,再加入固体硫酸铵至 0.8 饱和度,放置,离心,5500 转/分,30 分钟,收集沉淀,用水溶解到 400 毫升。

每 114 毫升酶液加 85 毫升磷酸钙凝胶(1.6 克干重)。0℃ 搅拌 5 分钟,离心,除去清液,用 216 毫升 0.1M pH7.5 磷酸缓冲液洗涤凝胶,离心,收集清液,用固体硫酸铵沉淀,收集 0.5 到 0.7 饱和度部分,用少量水溶解,冷冻保存备用。

磷酸钙凝胶制备 150 毫升氯化钙溶液(132 克 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/1000$ 毫升)用水稀释至 1600 毫升,用 150 毫升磷酸钠溶液(152 克 $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}/1000$ 毫升)摇动,混合物用稀醋酸调到 pH7.4,沉淀用大量水倾泌法洗涤多次,最后用蒸馏水洗涤,离心得约 9 克磷酸钙凝胶,测其干重。

2. 葡糖-6-磷酸脱氢酶溶液 用上述方法制得的酶液,用已知含量的辅酶 II 测定。

3. 0.1M 氯化镁溶液

4. 葡糖-6-磷酸钠溶液 G-6-P· $\text{Na}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 100 毫克溶解于 10 毫升蒸馏水中。或 G-6-P· $\text{Ba} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 150 毫克溶于 10 毫升 pH2 的水,用无水硫酸钠去钡离子,离心,清液备用。

5. 1M, pH8.0 Tris 缓冲液 12.12 克三羟甲基氨基甲烷溶于 25 毫升蒸馏水加 27.5 毫升 2N 盐酸稀释到 100 毫升。

6. 样品 NADP^+ 溶液 10 毫克 NADP^+ 样品溶于 10 毫升蒸馏水。

操作步骤

试 剂	组 别	空 白	样 品
Tris 缓冲液		0.5 毫升	0.5 毫升
氯化镁溶液		0.2 毫升	0.2 毫升
葡糖-6-磷酸钠溶液		0.1 毫升	0.1 毫升
NADP^+ 样品溶液		—	0.2 毫升
蒸馏水		2.1 毫升	1.9 毫升
葡糖-6-磷酸脱氢酶		0.1 毫升	0.1 毫升

在 1 厘米光径的比色杯中,紫外分光光度计先读取加酶前的 340 毫微米的光密度,为 E_0 ; 加酶搅匀后,读取 340 毫微米的光密度,直到读数不升高为止,为 E_1 。

计算

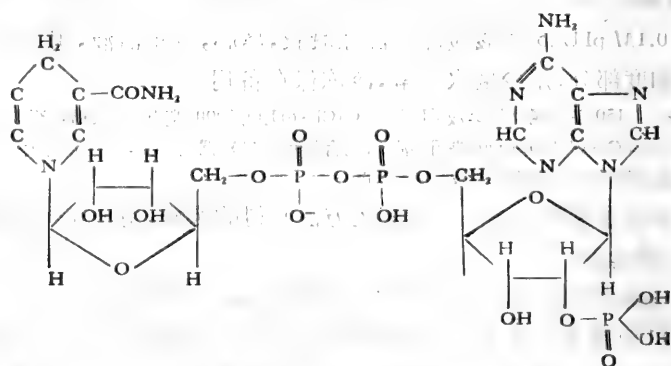
$$\Delta\text{OD}_{340} = (E_1 - E_0)_{\text{样品}} - (E_1 - E_0)_{\text{空白}}$$
$$\text{NADP}^+ \% = \frac{\Delta\text{OD}_{340} \times \text{稀释倍数}}{\text{比色杯光径} \times \text{克分子消光系数}} \times \frac{1}{\text{样品浓度}} \times 100 \%$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\Delta OD_{340} \times \frac{3}{0.2}}{1 \times 6.22 \times 10^3} \times 743.4 \times \frac{1}{1} \times 100\% \\
 &= \frac{\Delta OD_{340} \times 15 \times 743.4}{6.22 \times 10^3} \times 100\%
 \end{aligned}$$

四、还原型辅酶 II——谷胱甘肽还原酶法^[4]

原理

还原型菸酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸，又称还原辅酶 II，(还原型 NADP, $\text{NADPH} + \text{H}^+$) 分子式为：



NADPH 在氧化型的谷胱甘肽存在的条件下被谷胱甘肽还原酶定量催化氧化成辅酶 II。



此反应的平衡常数有利于形成 NADP^+ 。通过在 340 毫微米波长下光吸收的减少来测定 NADPH 的含量。

试剂

1. 谷胱甘肽还原酶的制备 干豌豆 40℃ 以下烘过或者晒干后用石磨磨成粉，200g 豌豆粉溶于 2000 毫升 pH6.7, 0.1M 磷酸缓冲液抽提，用冰冷却，搅拌抽提 4 小时后离心，5000 转/分，30 分钟，弃沉淀。

清液每 1000 毫升加 243 克硫酸铵到 40% 饱和，放置 10 分钟，离心，弃沉淀。

清液每 1000 毫升加 63 克硫酸铵到 50% 饱和，0℃ 放置过夜，离心收集沉淀，测定时取少量沉淀溶于水。

2. pH6.7, 0.1M 磷酸缓冲液 称 15.6 克 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 12.36 克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 加水加热使溶，用水稀释至 2000 毫升。

3. $\text{NADPH} \cdot \text{Na}_4$ 称 1 毫克溶解于 2 毫升蒸馏水中。

$\text{NADPH} \cdot \text{Ba}_2$: 称 1 毫克溶解于 2 毫升蒸馏水中，加少量无水硫酸钠，离心除去硫酸钡

沉淀即可。

4. 0.1M 谷胱甘肽 称 30 毫克溶解于 0.6 毫升蒸馏水中。

操作步骤

按下列步骤加入：

步 骤	空 白	样 品
0.1M 谷胱甘肽：	0.1 毫升	0.1 毫升
0.1MpH7.5 Tris 缓冲液：	2.8	2.4
还原型 NADP 样品液	0.1 × 7.11	0.4
谷胱甘肽脱氢酶：	0.1	0.1

在 1 厘米光径的比色杯中，紫外分光光度计先读取加酶前的 340 毫微米的光密度为 E_0 ，加酶搅匀后读取 340 毫微米的光密度，直至读数不再降低为止，为 E_1 。

计算

$$\Delta OD_{340} = (E_0 - E_1)_{\text{样品}} - (E_0 - E_1)_{\text{空白}}$$
$$\text{还原型 NADP \%} = \frac{\Delta OD_{340} \times \text{稀释倍数}}{\text{比色杯光径} \times \text{克分子消光系数}} \times \text{分子量} \times \frac{1}{\text{样品浓度}} \times 100 \%$$

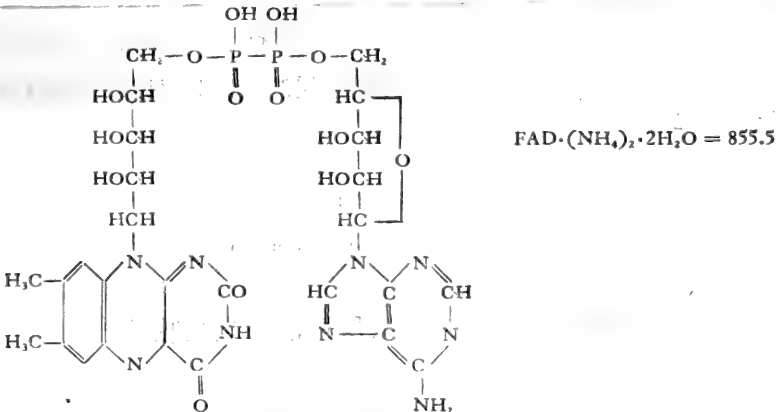
$$\text{NADPH} \cdot \text{Na}_4 \% = \frac{\Delta OD_{340} \times 832 \times 15}{6.22 \times 10^3} \times 100 \%$$

$$\text{NADPH} \cdot \text{Ba}_2 \% = \frac{\Delta OD_{340} \times 1015 \times 15}{6.22 \times 10^3} \times 100 \%$$

五、黄素腺嘌呤二核苷酸——光吸收法^[4]

原理

黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)，分子式为：



利用 FAD 在 450 毫微米的光吸收值进行含量测定。

操作步骤

称取 10 毫克 $\text{FAD} \cdot (\text{NH}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 样品以 0.1M 磷酸缓冲液 (pH7.0) 溶解, 取 0.2 毫升稀释到 10 毫升, 450 毫微米读取光密度值, 以 0.1M 磷酸缓冲液作对照。

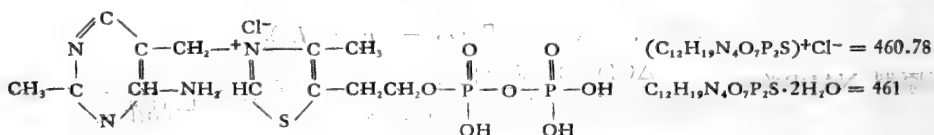
计算

$$\begin{aligned}\text{FAD} \cdot (\text{NH}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \% &= \frac{\Delta\text{OD}_{450}}{\text{克分子消光系数}} \times \text{分子量} \times \frac{1}{\text{浓度}} \times 100\% \\ &= \frac{\Delta\text{OD}_{450}}{11.3 \times 10^3} \times 855.5 \times \frac{1}{\text{C}} \times 100\%\end{aligned}$$

六、硫胺素焦磷酸——纸层析法和光吸收法^[5]

原理

焦磷酸硫胺素 (TPP), 又称辅羧酶 (cocarboxylase), 分子式为:



利用焦磷酸硫胺素在 245 毫微米的光吸收值测定含量, 纸层析进行纯度鉴定。

操作步骤

1. 纸层析 50—100 微克。纯。

溶剂系统 正丁醇: 异戊醇: 水: 异丁酸: 28% 氨水 = 7.2: 2.5: 7.5: 12: 0.2。

R_f 值为:

	硫胺素 (T)	硫胺素单磷酸 (TMP)	硫胺素焦磷酸 (TDP 或 TPP)	硫胺素三磷酸 (TTP)
文献值	0.7	0.45	0.2	0.05
测定值	0.7	0.4	0.1	

2. 含量测定 称取 10 毫克样品溶于 10 毫升蒸馏水, 取 0.40 毫升样品加 19.60 毫升 pH4.5 的 0.05M 醋酸缓冲液, 在 245 毫微米以缓冲液作对照读取光密度值。Cl⁻ 型克分子消光系数 = 12.9×10^3 。

$$\text{含量} = \frac{\Delta\text{OD}_{245} \times 461 \times 50}{12.9 \times 10^3} \times 100\%$$

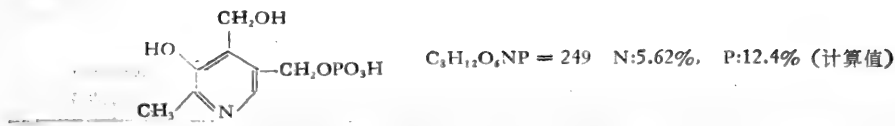
(含量 > 90% 合格, 100°C 真空干燥测得水份 ~ 8%)

七、磷酸吡哆醇——纸层析法和光吸收法^[6]

原理

磷酸吡哆醇 (2-methyl-3-hydroxy-4-hydroxymethyl-5-pyridylmethylphosphoric acid), 分

子式为:



利用磷酸吡哆醇在 290 毫微米的光吸收值进行含量测定,以及纸层析进行纯度鉴定。

操作步骤

1. 纸层析 溶剂系统 叔丁醇:水:89% 甲酸(70:15:15)。
R_f 值为 0.47~0.52 (文献值)。
2. 紫外吸收 配制成 40—44 微克/毫升,在 1 厘米光径的石英杯中测定。

波长 nm	克分子消光系数 E _m	溶 剂 系 统
290	8700	0.1NHCl
253	3700	0.1M pH7 磷酸盐缓冲液
325	7400	0.1MpH7 磷酸

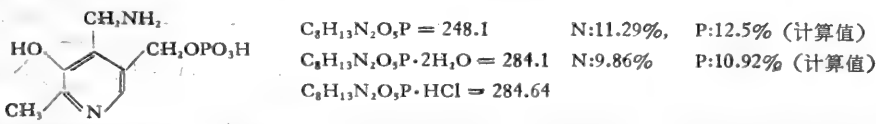
3. 含量测定 10.0 毫克样品溶于 100 毫升 0.1N HCl 中,取 0.6 毫升加 2.40 毫升 0.1N HCl,在 1 厘米石英杯中在 290 毫微米以 0.1N HCl 对照,读取光密度值。

$$\text{含量} = \frac{\frac{\Delta OD_{290}}{8700} \times 249 \times 100 \times 5}{\text{秤样毫克数}} \times 100\% = \frac{14.3 \times \Delta OD_{290}}{\text{秤样毫克数}} \times 100\%$$

八、磷酸吡哆胺——纸层析法和光吸收法

原理

磷酸吡哆胺 (2-methyl-3-hydroxy-4-aminomethyl-5-pyridylmethylphosphoric acid), 分子式为:



利用磷酸吡哆胺在 293 毫微米的光吸收值进行含量测定,以及纸层析进行纯度鉴定。

操作步骤

1. 纸层析 溶剂系统 叔丁醇:水:89% 甲酸(70:15:15)。
R_f 值为 0.2~0.3 (文献值)。
2. 紫外吸收 含二分子结晶水的磷酸吡哆胺样品配成 40—44 微克/毫升,在 1 厘米光径的石英杯中测定。
3. 含量测定 10.0 毫克二分子结晶水的磷酸吡哆胺溶于 100 毫升 0.1N HCl,取 0.3 毫升加 2.70 毫升 0.1N HCl,在 1 厘米石英杯中在 293 毫微米以 0.1N HCl 对照,读取光密度值。

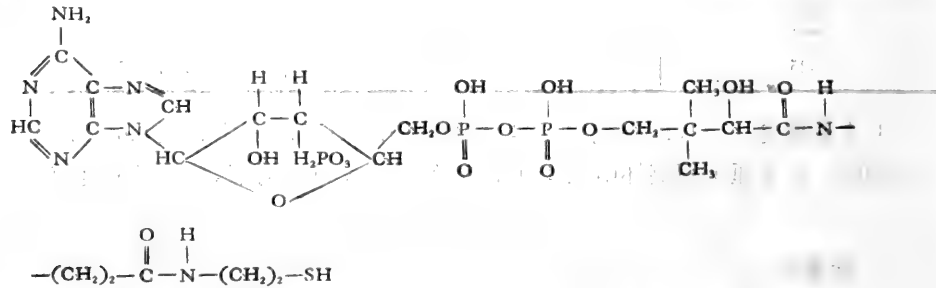
波长 nm	克分子消光系数 ϵ_m	溶 剂 系 统
293	9000	0.1N HCl
253	4700	0.1M pH7 磷酸盐缓冲液
325	8300	0.1M pH7 磷酸盐缓冲液

$$\text{含量} = \frac{\frac{\Delta OD_{293}}{9000} \times 284 \times 100 \times 10}{\text{秤样毫克数}} \times 100\% = \frac{31.7 \times \Delta OD_{293}}{\text{秤样毫克数}} \times 100\%$$

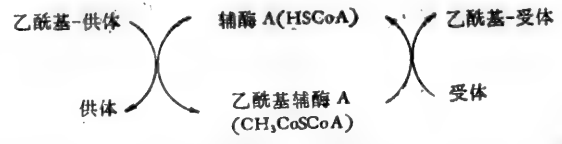
九、辅酶 A——乙酰化酶-磺胺法^[7]

原理

辅酶 A, (CoA), 分子式为:



辅酶 A 主要参与酰基化作用, 是乙酰化酶的辅酶, 起传递酰基的作用。



利用这一作用, 选用磺胺法进行辅酶 A 的测定。即以醋酸盐作为乙酰基-供体, 以磺胺作为受体; 在乙酰化酶 (取自鸽肝) 的作用下, ATP 的能量供给下, 辅酶 A 就将醋酸上的醋酸根转换至对氨基苯磺酰胺上, 生成乙酰磺胺 ($H_2NSO_2-C_6H_4-NH_2 \rightarrow H_2NSO_2-C_6H_4-NHCOCH_3$)。在乙酰化酶、ATP、醋酸盐及磺胺皆过量的情况下, 辅酶 A 的多少就决定了反应的进行程度, 剩下的没有被乙酰化的磺胺则可进行重氮化 ($H_2NSO_2-C_6H_4-N \equiv NCl$), 而与萘乙胺形成淡红色溶液, 于 454 毫微米波长比色测出剩下的磺胺量。因为磺胺是过量的, 又是定量的, 所以乙酰化了多少磺胺就可直接计算出来。当以已知单位的辅酶 A 的标准品作为对照时, 则可计算出未知样品的辅酶 A 的单位。

试剂

1. 辅酶 A 标准液的配制 精确称取辅酶 A 标准样品, 溶于水配成 40 单位/毫升, 深冻保存, 使用时稀释至一定单位, 储存液在二周内不会下降。

2. 混合液 取纯度 70% 以上的 ATP 钡盐 1.2 克溶于 20 毫升 0.1N 盐酸中 (用冰

浴),加入0.4克无水硫酸钠,以除去钡离子,过滤,取滤液,再加入几粒硫酸钠结晶,如无白色沉淀产生,则表示钡离子已去尽。在溶液中加入25毫升0.25M柠檬酸钠,5.6毫升0.02M磺胺,6.25毫升1M醋酸铵及20毫升,pH7.0~7.4,加蒸馏水至总体积达126.25毫升,深冻保存备用。

3. 1M Tris 缓冲液 12.1克三羟甲基氨基甲烷溶于25毫升蒸馏水和11毫升4N盐酸,0.5N氢氧化钠调至pH8.0—8.4,最后加水至100毫升。

4. 0.2M 半胱氨酸盐溶液 精确称取1.5763克半胱氨酸盐酸盐,溶于50毫升蒸馏水中。新鲜配制。

5. 5% 三氯醋酸溶液

6. 0.1% 亚硝酸钠溶液 新鲜配制。

7. 0.5% 对氨基磺酰胺溶液

8. 0.1% 萘乙胺盐酸盐溶液

9. 乙酰化酶的制备 取鸽子杀头放血,迅速取出鸽肝,去脂肪,剪碎掷入已用固体二氧化碳冷至 -10°C 的丙酮中,所有鸽子杀完后,将鸽肝碎块捞出,加以新鲜冷丙酮中($-5^{\circ}\sim-10^{\circ}\text{C}$),在组织捣碎机上捣碎2—3分钟,在布氏漏斗上抽滤,并以无水新鲜丙酮洗涤2—3次,置真空干燥器中抽干,在研钵中研碎,并以20目的铜筛子筛过,去除结缔组织,此即鸽肝丙酮粉,置干燥器冷藏保存。

取鸽肝丙酮粉加入十倍0.02N碳酸氢钾溶液,在匀浆器匀之,然后离心(4000转/分)5分钟,倾出红色混浊的上层液,在 -20°C 左右冷冻过夜,次晨融化后,在 30°C 保温4小时,以破坏肝抽提液中原有的辅酶A,然后,离心(20000转/分)10分钟,得红色澄清液,深冻保存备用。

操作步骤

取 1×10 厘米试管,从第1—4管为空白,即不加辅酶A,第5—7管加入1单位辅酶A标准品,第8—10管加入2单位辅酶A标准样品,分别表示低剂量和高剂量。自第11管起,视样品数量而决定用多少管,每一样品4支管,前二者为低剂量(约1单位),后二者为高剂量(约2单位),样品体积分别为0.2及0.4毫升。在加入辅酶A标准样品或样品前,自第一管开始,全部加入0.15毫升Tris缓冲液和0.1毫升0.2N半胱氨酸盐溶液。然后在各管按顺序加入0.5毫升混合液,以及补充水使反应体积达1.6毫升。再加入0.15毫升乙酰化酶溶液,摇匀,在 38°C 水浴中保温1.5小时,加入4毫升5%三氯醋酸中止反应。混匀后离心,取清液1毫升加入预先有10毫升0.2N盐酸的试管,各加1毫升0.1%亚硝酸钠,摇匀,作用5分钟,再加入1毫升0.5%对-氨基磺酰胺,破坏剩余的亚硝酸盐,以免干扰样品的测定。在比色前,各加入1毫升0.1%萘乙胺盐酸盐,摇匀,用2厘米比色杯,于 $545\text{m}\mu$ 波长比色,读取光密度值。

计算

将空白及高、低剂量OD值平均后,以空白OD值减去各组OD值,得 ΔOD 值,以标准样品的高、低剂量的 ΔOD 值之和为准($\Delta\text{OD}_{\text{SH}} + \Delta\text{OD}_{\text{SL}}$)对比样品中 ΔOD 值的和($\Delta\text{OD}_{\text{TH}} + \Delta\text{OD}_{\text{TL}}$)即可得出样品中的相对比值,将此值乘上标准样品的单位浓度及样



S0011917

品的稀释倍数,即得样品的单位值。

讨论

乙酰化酶的质量对测定有影响,根据高、低剂量的光密度差值来判断,一般要求光密度差值在 0.050~0.070 左右。

参 考 资 料

- [1] Ciotti, M. M. & Kaplan, N. O., *Methods in Enzymology*, vol. 3, 89, (1957).
- [2] Naltmann, E. A., Guber, C. J. & Kuby, S. A., *J. Biol. Chem.*, 236(5), 1225, (1961).
- [3] Lowry, O. H. & Passonneau, J. V., *Methods in Enzymology*, vol. 6, 792, (1963).
- [4] Huennkens, F. M. & Felton, S. P., *Methods in Enzymology*, vol. 3, 894, 950, (1957).
- [5] Mano, Y., *J. Biochem.*, 47, 24, (1960).
- [6] Peterson, E. A. & Sober, H. A., *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 169, (1954).
- [7] Woreeli, G. D., *Method in Enzymology*, vol. 3, 913, (1957).

北京植物所

收到期	82.10.26
来 源	西单新
书 价	2.15元
单据号	0044592
开票日期	82.10.25.

23019

58.1734

721

书 名 生物物质常用化学分析法

蔡武城 袁厚积 主编 1982.8.

借者姓名 借出日期 还书日期

徐第98 89.8.13.14

徐第8 89.10.11

董第2 89.11.13

董第2 89.10.15

分类编号

58.1734

721

登记号23019

读者注意

1. 爱护公共图书切勿任意卷折和涂写，损坏或遗失照章赔偿。
2. 请在借书期限前送还以便他人阅读请给予合作。

成1106-1

统一书号: 13031·1965

定 价: 2.15 元

本社书号: 2671·13-10

科技新书目: 30-39